

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. U. Engelmann

Immunhistochemische Untersuchung von Ki67
und p53 in muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen
und deren Zusammenhang mit dem klinischen und
histopathologischen Stadium

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Renate Tinca Wormland geb. Radu
aus Temeschburg/Rumänien

Promoviert am 18. August 2010

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. G. Haupt
2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. U. Engelmann

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Prof. Dr. med. G. Haupt

Herrn Prof. Dr. med. W. Bloch

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Velbert, den 03. März 2009

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. med. G. Haupt und Herrn Professor Dr. med. W. Bloch von mir selbst im Labor der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universität zu Köln ausgeführt worden.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Gerald Haupt danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, des Laborarbeitsplatzes und die Begleitung der Arbeit.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Udo Engelmann danke ich ebenfalls für die Begleitung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Mark Goepel für die menschliche Betreuung bei der Erstellung des Manuskriptes. Unter seiner Führung in der Klinik habe ich das wissenschaftliche Denken erlernt.

Herzlich danke ich Frau Anke Siefer für die geduldige Einführung in die Lehre der Statistik.

Herzlicher Dank gilt meiner gesamten Familie für die moralische Unterstützung.

Besonders herzlichen Dank richte ich an meinen Ehemann für die Geduld und die Gabe, mich während der Erstellung des Manuskriptes immer wieder motivieren zu können.

Für Nils und Tinca Helene

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Anatomie der Harnblase	1
1.2. Das Harnblasenkarzinom	2
1.2.1. Inzidenz, Epidemiologie und Risikofaktoren	2
1.2.2. Histopathologie	3
1.3. Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	4
1.4. Uringebundene Markersysteme	5
1.5. Therapie des Harnblasenkarzinoms	6
1.6. p53	8
1.7. Ki67	11
1.8. Die Immunhistochemie	12
2. Fragestellung und Zielsetzung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.2. Verwendete Reagenzien, Labormaterialien und Geräte	18
3.2.1. Reagenzien	18
3.2.2. Labormaterialien	20
3.2.3. Geräte	21
3.3. Zubereitung der benötigten Pufferlösungen, Detergenzien und Stringenzen	22
3.4. Einleitende Maßnahmen	24
3.5. Versuchsmethodik	24
3.6. Auswertung am Lichtmikroskop	27
3.7. Statistik	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Immunhistochemische Ergebnisse	28
4.2. Statistische Ergebnisse	35
4.2.1. Alter und Geschlechtsverteilung	35
4.2.2. Auswertung des Tumorstadiums (T) der untersuchten Harnblasenkarzinome	36
4.2.3. Lymphknotenbeteiligung (N)	36
4.2.4. Auftreten von Fernmetastasen (M)	37
4.2.5. Differenzierungsgrad der untersuchten Karzinome	37
4.3. Statistische Auswertungen der Ki67 und p53-Indizes in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors, dem Tumorstadium und dem Lymphknotenstatus	38
4.3.1. Mittelwerte für den p53 und Ki67 Färbeindex; aufgeteilt nach dem Differenzierungsgrad des Tumors (G)	38
4.3.2. Zusammenhang zwischen dem p53-Färbeindex und dem Grading des Tumors (G)	39

4.3.3.	Zusammenhang zwischen dem Ki67-Färbeindex und dem Grading des Tumors (G)	41
4.3.4.	Mittelwerte für den p53 und Ki67-Färbeindex; aufgeteilt nach dem Tumorstadium (T)	42
4.3.5.	Zusammenhang zwischen dem p53-Färbeindex und dem Tumorstadium (T)	43
4.3.6.	Zusammenhang zwischen dem Ki67-Färbeindex und dem Tumorstadium (T)	44
4.3.7.	Mittelwerte für den Ki67- und p53-Färbeindex; aufgeteilt nach dem Lymphknotenstatus (N)	45
4.3.8.	Zusammenhang zwischen dem Ki67-Färbeindex und dem Lymphknotenstatus (N)	46
4.3.9.	Zusammenhang zwischen dem p53-Färbeindex und dem Lymphknotenstatus (N)	47
4.3.10.	Korrelationen nach Spearman für die Variablen T (Tumorstadium), N (Lymphknotenstatus und G (Differenzierungsgrad des Tumors) in Zusammenhang mit dem p53- und Ki67-Index	48
4.4.	Statistische Auswertungen der unterschiedlichen Intensitäten (0-3) von Ki67 und p53 in Zusammenhang mit dem Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Differenzierungsgrad des Tumors	49
4.4.1.	Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von p53 in Zusammenhang mit dem Tumorstadium (T)	50
4.4.2.	Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von Ki67 in Zusammenhang mit dem Tumorstadium (T)	51
4.4.3.	Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von p53 in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N)	52
4.4.4.	Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von Ki67 in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N)	53
4.4.5.	Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von p53 in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G)	54
4.4.6.	Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von Ki67 in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G)	55
4.5.	Kreuztabellen und Balkendiagramme.	56
4.5.1.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT) - Absolute Häufigkeiten	56
4.5.2.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT) - Relative Häufigkeiten	57
4.5.3.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT) - Absolute Häufigkeiten	58

4.5.4.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT) - Relative Häufigkeiten	59
4.5.5.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N) - Absolute Häufigkeiten	60
4.5.6.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N) - Relative Häufigkeiten	61
4.5.7.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N) - Absolute Häufigkeiten	62
4.5.8.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N) - Relative Häufigkeiten	63
4.5.9.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G) - Absolute Häufigkeiten	64
4.5.10.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G) - Relative Häufigkeiten	65
4.5.11.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G) - Absolute Häufigkeiten	66
4.5.12.	Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G) - Relative Häufigkeiten	67
5.	Diskussion	68
5.1.	Beurteilung der Methodik und möglicher Fehlerquellen	68
5.2.	Diskussion der Ergebnisse für p53	69
5.2.1.	p53 als Therapieziel	72
5.3.	Diskussion der Ergebnisse für Ki67	73
6.	Zusammenfassung	76
7.	Literaturverzeichnis	77
8.	Anhang	88
9.	Lebenslauf	92

Abkürzungsverzeichnis

(1)	Verweis auf Nummer im Literaturverzeichnis
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BTA	Bladder Tumor Antigen
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CA.	Karzinom
CHRON.	chronisch
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DNA	Desoxiribonukleinsäure
g	Gramm
G.-Zellen	Gesamtzellen
GEBDAT.	Geburtsdatum
GOF	gain of funktion
GRANU.	granulierende
HRP	Meerrettichperoxidase
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
MDM2	mouse-double minute-2
ml	Milliliter
μ	My
μl	Microliter
Nr.	Nummer
OPDAT.	Operationsdatum
pos.	positiv
rs	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearmann
u.a.	unter anderem
VERHORN.	verhornendes
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Malignome sind neben Herz- und Gefäßerkrankungen in der westlichen Welt die zweithäufigste Todesursache. Sie zeigen eine steigende Tendenz. Das Urothelkarzinom der Harnblase ist der zweithäufigste Tumor im Urogenitaltrakt und der sechsthäufigste Tumor überhaupt. Er hat mit 60% - 80% die höchste Rezidivrate aller Tumoren (12). Trotz intensiver Bemühungen sind die Therapiemöglichkeiten immer noch unbefriedigend. Im fortgeschrittenen Stadium steht keine kurative Möglichkeit zur Verfügung, so dass Malignome weiterhin ein Schwerpunkt der Forschung sind und sein werden.

1.1. Anatomie der Harnblase

Die Harnblase liegt beim Erwachsenen als Organ des kleinen Beckens dicht hinter der Symphyse. Sie besteht hauptsächlich aus einem glatten Muskel, dem Detrusor. Die Form der Harnblase ist die eines Tetraeders, wenn sie leer ist. Jede der 4 Oberflächen ist gleichzusetzen mit einem gleichschenkligen Dreieck, dessen Seiten 12 cm betragen. Wenn die Harnblase gefüllt ist, ist sie ovoid.

Die Blase ist eingeteilt in folgende Regionen: die Basis oder der Fundus der Blase (inferior und posterior); das Trigonum, die Fläche zwischen der Mündung der beiden Ureteren und der Urethra; der Blasendom und schließlich der Blasen Hals.

Histologisch gesehen besteht die Blasenwand hauptsächlich aus drei Schichten. Eine dünne Schicht eines Übergangsepithels (Urothel), welche auf einer Schicht von Kollagen und elastischen Fasern ruht, die lamina propria mucosa. In der lamina propria befindet sich eine dünne Schicht von glatten Muskelfasern, die muskularis mucosa. Unter der lamina propria befindet sich der Detrusormuskel, ein Geflecht zufällig angeordneter glatter Muskelfasern.

Das normale Urothel der Blase besteht aus 6-7 Zellreihen. Typisch für das Uroepithel sind die Schirmzellen, die lumenwärts liegen. Auf diesen Schirmzellen befindet sich, ebenfalls lumenwärts, eine hialinsäurehaltige

Mukopolysacharidschicht. Auf der muskelzugewandten Seite wird das Epithel durch die Basalmembran bedeckt.

Die Harnblase wird von den Arteriae vesicales superiores, mediae und inferiores mit Blut versorgt, alle aus der Arteriae iliacae internae entspringend. Häufig sind weitere Zuflüsse möglich: z.B. aus der Arteriae obturatoriae, den Arteriae gluteae inferiores sowie bei Frauen aus Ästen von Vaginal- und Uterusarterien.

Der ausgeprägte venöse Plexus, welcher die Harnblase umgibt, drainiert das venöse Blut in die Venae iliacae internae.

Der Lymphabfluss erfolgt über die Nodulii vesicales, Nodulii arteriae iliacae externae, internae und communis.

1.2. Das Harnblasenkarzinom

1.2.1. Inzidenz, Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom befindet sich an sechster Stelle weltweit und stellt 3% - 4% aller malignen Tumoren dar (55). Beim Mann steht das Harnblasenkarzinom an vierter Stelle nach Lunge, Prostata und Kolonkarzinom. Bei der Frau steht es an zehnter Stelle. Die Inzidenz steigt mit dem Alter. 2/3 der Fälle kommen bei Personen vor, die älter als 65 Jahre sind. In den industrialisierten Ländern ist die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms höher als in ländlichen Regionen (66).

Weißer Europäer/Nordamerikaner haben die höchste Inzidenz gegenüber Lateinamerikanern und Afrikanern. Die niedrigste Inzidenz haben asiatische Bevölkerungsgruppen (66).

Es gibt verschiedene exogene Kanzerogene, welche das Harnblasenkarzinom begünstigen. Z.B. chemische Farbstoffe (aromatische Amine) u.a. 2-β-Naphtylamin, 4 Aminobiphenyl und Benzidine. Zigarettenkonsum, Medikamente wie Phenacetin, Cyclophosphamid, Infektionen mit *Shistosoma haematobium*,

chronische Harnwegsinfekte und nicht zuletzt die Balkannephropathie zählen ebenfalls zu den exogenen Kanzerogenen.

Zusätzlich zu den äußeren Faktoren gibt es ebenfalls genetische Faktoren, die zu einem Blasenkarzinom führen können. Das invasiv wachsende Urothelkarzinom zeigt eine große Anzahl von genetischen Veränderungen auf verschiedene Chromosomen. Zum Beispiel führt der Verlust bzw. Teilverlust von Chromosom 9 zum Verlust eines Tumorsuppressor Gens, genannt DBC1. Den Verlust auf Chromosom 11p und 17p setzt man mit einer möglichen Entwicklung eines Blasenkarzinoms mit hohem Grading gleich.

1.2.2. Histopathologie

90% der Tumoren sind Transitionalzellkarzinome (Urothelkarzinome), 7% sind Plattenepithelkarzinome, 2% sind Adenokarzinome.

Im Nahen Orient und Ägypten, wo die Infektion mit Schistosoma Haematobium endemisch ist, sind 55%-80% der diagnostizierten Blasenkarzinome. Bei 75% der Urothelkarzinome findet man bei der Erstdiagnose ein oberflächliches Harnblasenkarzinom (12).

Die WHO Klassifikation von 2004 unterscheidet zwischen flachen Läsionen mit Atypien, nichtinvasive papilläre urotheliale Läsionen und invasiven Urothelkarzinome (43).

Zu den flachen Läsionen mit Atypien gehören die Dysplasie, eine präneoplastische Läsion und das Carcinoma in situ (CIS). Diese Läsionen beschränken sich auf die Urothelschleimhaut. Eine Dysplasie ist als Vorstufe zum Carcinoma in situ anzusehen, während das Carcinoma in situ als obligate Vorstufe zum invasiven Urothelkarzinom gilt.

Zu der Gruppe der nichtinvasiven papillären urothelialen Läsionen gehören das Papillom sowie das invertierte Papillom, die als benigne urotheliale Läsionen gelten. Zusätzlich gehören dazu die papillären urothelialen Neoplasien (pTa Tumoren) mit niedrig malignem Potenzial (PUNLMP). Diese beschränken sich ebenfalls nur auf das Urothel. Auch auf die Schleimhaut beschränkt ist das

nichtinvasive papilläre urotheliale Low-grade-Karzinom (PUC) und das nicht invasive urotheliale High-grade-Karzinom.

Die invasiven Urothelkarzinome kann man unterteilen in:

Karzinome mit Invasion der Lamina propria, wobei man hier Karzinome unterscheidet in solche, die nicht die muskularis mucosae erreichen (pT1a), in solche, die die Muscularis mucosae erreichen (pT1b) und in solche, die sie überschreiten (pT1c).

Karzinome mit Invasion der Muscularis propria (des Musculus Detrusor Vesicae) (T2-4).

Invasive Urothelkarzinome werden analog zu den nichtinvasiven PUC in Low-grade und High-grade-Formen unterteilt.

Es gibt noch verschiedene Varianten des invasiven Urothelkarzinoms, z. B. das Urothelkarzinom mit plattenepithelialer und/oder glandulärer Differenzierung, das sarkomatoide Urothelkarzinom mit throphoblastischer Differenzierung und lymphoepithelialer Differenzierung.

Das invasive Urothelkarzinom mit squamöser (plattenepithelialer) Differenzierung kommt in 21% der Urothelkarzinome der Blase vor (41). Die squamöse Differenzierung tritt bei Tumoren mit einem höheren Grading und Staging auf. Somit ist das Erscheinen der plattenepithelialen Differenzierung mit einer schlechten Prognose verbunden. Als immunhistochemische Marker für die squamöse Differenzierung gelten Cytokeratin 14 und L1 Antigen.

Die Metastasierung des Harnblasenkarzinoms erfolgt per continuitatem, lymphogen und vasculär. Die häufigsten Fernmetastasenlokalisationen sind Lunge, Leber und Knochen.

1.3. Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Das häufigste Symptom des Blasentumors ist die Hämaturie, wobei das Ausmaß der Blutbeimengung nicht mit dem Tumorstadium korreliert. Eine Hämaturie fordert die Abklärung des Harntraktes auf das Vorliegen eines Tumors. Nach der klinischen Untersuchung, Sedimentuntersuchung, Urinkultur zum Ausschluss eines Harnwegsinfektes, falls eine symptomatische

Leukozyturie besteht, und der Sonographie des Abdomens, ist die Urinzytologie ein wichtiges der nichtinvasives Diagnoseverfahren (55). Es sollte beim klinischen Verdacht auf einen Harnblasentumor und in der Nachsorge nach Urothelkarzinomen zur Anwendung kommen. Zur zytologischen Diagnostik eignen sich: Spontanurin, Harnblasenspülflüssigkeit, Spülungen aus dem oberen Harntrakt, Urethrastumpfspülungen und Urin aus Harnableitungen bei Patienten nach Zystektomie. Die Spezifität des Verfahrens ist sehr hoch (über 90%) (55).

Die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms wird zystoskopisch gestellt. Bei der endoskopischen Untersuchung wird Lokalisation, Anzahl und Wachstumstyp der Tumore festgestellt.

Da bis zu 5% der Urothelkarzinome im oberen Harntrakt wachsen, ist eine Urographie Bestandteil der präoperativen Diagnostik.

Die transurethrale Resektion vollendet die Diagnostik und leitet gleichzeitig auch die Therapie ein. Bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen muss man die Diagnostik erweitern, um die genaue Ausdehnung der Tumoren und des Filialisierungsausmaßes zu erfassen.

1.4. Uringebundene Markersysteme

Uringebundene Markersysteme haben das Ziel, die Detektionsrate des Harnblasenkarzinoms zu steigern. Vor allem bei hochdifferenzierten Tumoren will man damit die schwache diagnostische Treffsicherheit der Urinzytologie verbessern. In den vergangenen Jahren wurden viele uringebundene Markersysteme im Rahmen der Primärdiagnostik, aber ebenso zur Therapiekontrolle von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom eingesetzt.

Das BTA (Bladder Tumor Antigen) kann man im Schnelltest nachweisen. Die BTA-Stat- bzw. BTA-TRAK-Tests detektieren ein dem Komplementfaktor H verwandtes Protein im Urin. Dieses Protein wird als Reaktion auf dem Tumor vermehrt an der Basalmembran exprimiert.

Das NMP-22 (Nuclear Matrix Protein) ist ein Bestandteil des Mitoseapparates. Bei Patienten mit Urothelkarzinom wurden signifikant höhere Werte, um das 25-fache, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen.

Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und der Mikrosatellitenanalyse können Urothelzellen mit chromosomalen Anomalien wie die Aneuploidie oder der Verlust der Heterozygotie detektiert werden.

Ein weiteres Markerprotein ist das Anti-Apoptose-Protein Survivin.

Der UBC-Test und der Cyfra21-1 Urintest detektieren Zytokeratine des Urothelkarzinoms.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann kein uringebundenes Markersystem die Zystoskopie und die Urinzytologie in der Diagnostik ersetzen. Aufgrund der hohen Rate falscher positiver Befunde sind die uringebundenen Markersysteme als Primärdiagnostik kritisch zu sehen.

1.5. Therapie des Harnblasenkarzinoms

Bei nichtinvasiven Blasentumoren ist die transurethrale Resektion die Therapie der Wahl. Bei pT1 Tumoren und bei pTa Tumoren, bei denen eine komplette Tumorresektion bei der Erstresektion nicht möglich war, besteht eine Indikation zur erneuten transurethralen Resektion.

Eine intravesikale Chemotherapie (z.B. mit Mitomycin, Doxorubicin, Thiotepa und Epodyl) und eine intravesikale Immuntherapie (z.B. BCG oder alpha-Interferon) sollen ein Tumorrezidiv und eine Progression des Tumors verhindern.

Beim Carcinoma in situ ist primär eine intravesikale Behandlung mit BCG und oder Zytostatika indiziert. Falls innerhalb von drei Monaten keine komplette Remission zu erreichen ist, sollte eine Zystektomie angeschlossen werden.

Die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie ist die Behandlung der Wahl eines muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms, falls man ein kurativer Ansatz verfolgt. Als palliativer Ansatz kann eine Zystektomie zur Verbesserung der Lebensqualität bei tumorbedingter Beeinträchtigung der Blasenspeicher oder der Entleerungsfunktion, bei Blutung oder tumorbedingten Schmerzen

dienen. Es gibt kontinente und nicht kontinente Urinableitungsmethoden nach einer Zystektomie.

Heutzutage gibt es Ansätze von Therapiestrategien mit Organerhalt. Dies beinhaltet die transurethrale Resektion plus die kombinierte Radiochemotherapie. Bei Rest- oder Rezidivtumoren wird eine Salvage-Zystektomie angestrebt. Dieses Konzept kann man jedoch nur bei Patienten anwenden, welche folgende Kriterien erfüllen: frühes Tumorstadium, unifokales Tumorstadium, Tumorgröße unter 5 cm, Fehlen einer lymphatischen oder vaskulären Infiltration (L0, V0), Fehlen einer ureteralen Obstruktion und kein begleitendes Carcinoma in situ.

Für die Chemotherapie verwendet man Substanzen wie Cisplatin und Gemcitabin.

Die alleinige Radiotherapie ist der kombinierten Radiochemotherapie deutlich unterlegen.

Die Überlebenszeit von Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom der Harnblase beträgt trotz des Einsatzes von Polychemotherapieprotokollen circa 14 Monate (10).

Neue molekulare Therapieansätze gewinnen zunehmend an Bedeutung. Damit will man selektiv das Wachstum von Tumorzellen hemmen. Dies erreicht man durch die Verabreichung von Antikörpern oder Enzyminhibitoren, welche spezielle Rezeptoren am/im Tumor besetzen. Zum Beispiel ist Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den HER2/neu-Rezeptor. Lapatinib ist ebenfalls ein Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher an EGRF/HER2-Rezeptoren bindet. Die Anwendung von target-spezifischen Substanzen allein oder in Kombination mit einer Chemotherapie ist bisher nur in Studienprotokollen durchgeführt. Sie eröffnen aber völlig neue Therapiestrategien gegenüber der bisherigen konventionellen Chemotherapie.

1.6. p53

Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, welche eine Rolle in der negativen Wachstumsregulation der Zelle spielen und dadurch Tumorentstehung verhindern.

Das TP53 Gen, lokalisiert auf das Chromosom 17q23, kodiert ein 53 kDa großes Protein, welches eine wichtige Rolle im Zellzyklus, in der Antwort der Zelle auf eine DNA-Schädigung, in der Apoptose und in der Neovaskularisation spielt.

Die Apoptose ist ein Prozess, welcher aktiv gesteuert ist und mit dessen Hilfe die Zellen ihren eigenen Zelltod in normalem und krankem Gewebe regeln.

Eine Mutation des TP53 Gens verleiht der Zelle die „Unsterblichkeit“ und somit die Verwandlung zur malignen Zelle. Obwohl es kein spezifischen Focus für die Mutation gibt, befinden sich mehr als 90% dieser auf dem Exon 4-9 (41).

Oft kann man TP53 Mutationen immunhistochemisch nachweisen, da viele dieser Mutationen zu einer Akkumulation eines funktionell nicht wirksamen p53 Protein im Nukleus führen. In normalen Geweben wird p53 nur in geringer Menge exprimiert, so dass es mit immunhistologischen Mitteln in der Regel nicht nachweisbar ist.

Das p53 Protein wurde Ende der 70er Jahre entdeckt. Das TP53 Gen ist in der Mehrheit der Tumoren entweder mutiert oder funktionell kompromittiert. Ein Fehler der DNA der Zelle wirkt wie ein Trigger auf die p53 induzierte Apoptose. Zuerst wird der DNA Fehler erkannt. Daraufhin wird nicht mutiertes „wild type p53“ stabilisiert und aktiviert. Das aktive p53 Protein wirkt als ein Transkriptionsfaktor der Zielgene von p53, welche in der Apoptosis involviert sind und somit verhindert wild type p53 ein Weiterleiten des Defektes. Der Verlust des wild type p53, des funktionell aktiven Proteins, durch Deletion oder Mutation verleiht der Tumorzelle den Vorteil, sich der p53 induzierten Apoptose zu entziehen.

Der Verlust des p53 Proteins wird mit einer erhöhten Instabilität des Genoms und einer erhöhten Aneuploidie korreliert.

Die bestbeschriebene Funktion von wild type p53 sind die Apoptose und der Zellzyklusarrest in der G0-G1-Phase. Der Zellzyklusarrest ermöglicht den DNA-

Polymerasen, die DNA-Reparatur durchzuführen. Neue Studien zeigen, dass der gewählte Weg, entweder der Stop des Zellzyklus oder der programmierte Zelltod, von zwei Punkten beeinflusst werden kann. Erstens von der Natur der Zielgene von p53 und zweitens vom Zeitpunkt, an dem diese Zielgene von p53 reguliert werden. Vousden zeigte, dass die Zielgene von p53, welche zum Arrest des Zell-Zyklus führen (WAF1 und TIGAR), schnell durch genotoxischen Stress aktiviert werden können. Hingegen die Zielgene von p53, welche die Apoptose mediierten (PUMA), zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert werden, nämlich wenn der genotoxische Stress persistiert. Die Aktivierung von PUMA führt zur Apoptose und Runterregulierung von WAF1 und TIGAR. Die p53 – dependente Apoptose wird durchgeführt durch eine Mitophagie, eine Autophagie der Mitochondrien. Diese wiederum hängt von BAX und BAK (beide sind mitochondriale Proteine) ab (63).

Eine andere wichtige Funktion des wild type p53 ist die Induktion der Seneszenz. Hinkal zeigte, dass Mäuse, die ein p53-Mutant exprimieren (hier fehlen die ersten 6 Exons), weniger spontane Tumoren hatten. Die Mutation induzierte jedoch ein schnelleres Altern dieser Mäuse im Vergleich zu den Mäusen mit wild type p53. Dieser Phenotyp hatte als Basis ein permanent aktives p53 Protein (ein „super p53“). Weiterhin wurden diese Mäuse mit dem „super p53“ einer hohen Dosis Gamma-Strahlen exponiert. Sie zeigten nach der Bestrahlung eine Verlangsamung der DNA-Reparatur, welche eher auf ein Altern der Zellen, statt auf einen Zelltod schließen lässt (16). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Altern eine biologische Konsequenz der p53 Aktivierung durch genotoxischen Stress ist.

Eine weitere wichtige Funktion von p53 ist die Fähigkeit, die Zellmigration zu regulieren. Der Verlust von p53 oder die Expression einer seiner Isoformen erhöht die Zellmigration und könnte somit zur Metastasierung beitragen.

Die häufigste Mutation von p53 in Tumoren ist eine Punktmutation. Dieses mutierte Protein unterscheidet sich vom wild type Protein durch eine Aminosäure (missense mutation). Die veränderte Proteinstruktur dieses Mutanten führt zur Destabilisierung von p53 und alteriert somit seine Fähigkeit, sich an die DNA zu binden. Missense Mutations zeigen einen Verlust der translationalen Aktivität, welche je nach Art der Mutation verschiedene Abstufungen erfährt.

Manche Mutanten können eine pro-onkogene Aktivität entwickeln. Diese pro-onkogene Aktivität wird auch oft als Erwerb einer Funktion „gain of function“ (GOF) genannt. Diese Eigenschaft des Mutanten wird nicht mit dem wild type Protein geteilt und ist unabhängig von seiner Fähigkeit, einen dominant negativen Effekt auf das wild type p53 auszuüben.

Die veränderten p53 Proteine, welche nach einer TP53 Mutation entstehen, können die Expression der dazugehörigen Gene anders als wild type p53 modulieren. Dies könnte eine Basis zur Erklärung der GOF-Funktion sein. Die GOF-Eigenschaften sind wiederum von Mutant zu Mutant verschieden. Z.B. kann GOF dem Tumor eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verleihen oder eine Induktion der Neoangiogenese durch die Hochregulierung der ID4 Gene verursachen.

Ein anderes Beispiel für die Möglichkeiten eines p53 Mutanten zur Tumorentstehung und Tumorprogress beizutragen, ist seine Fähigkeit, die Selektivität der Zielgene von Vitamin D3 so zu verändern, dass Vitamin D3 von einem proapoptotischen Agenten in einen antiapoptotischen Agenten umgewandelt wird.

Die Regulierung der Expression des p53 Mutanten funktioniert auf einem ähnlichem Weg wie die Regulierung von wild type p53 in vivo. Der Tumorsuppressor p53 wird engmaschig kontrolliert von MDM2 (Mouse-double-minute-2) Protein. Das p53-Protein wird aktiv durch MDM2 abgebaut und somit in der Zelle auf einem niedrigen Niveau gehalten. MDM2 bindet sich an p53 und vermindert dessen transcriptionale Aktivität und Stabilität. Viele Tumore produzieren MDM2 im Übermaß. Dadurch hemmen sie die p53 Funktion. In diesem Sinne würde eine Hemmung der p53-MDM2-Bindung eine Möglichkeit für Krebstherapien sein.

Andere Kontrollwege von p53 gehen z.B. über PIN1, PML, HDM4, IMPORTIN ALPHA3, E4F, TWIST1 und der verschiedenen p53 Isoformen. Das verdeutlicht nochmals die Heterogenität der möglichen p53 Störungen.

In vielen Tumoren ist die Mutation der TP53 Gene als ein frühes Ereignis in prämaligmem Gewebe erläutert worden. Vor allem in dem Gewebe, das karzinogenen Stoffe aus der Umwelt exponiert ist. Daten von Lebertumoren und Tumoren des Ösophagus zeigen, dass die TP53 Mutation früh in der natürlichen Historie dieser Tumoren auftritt (30). Daraus lässt sich ableiten,

dass im Initialstadium die Mutation von TP53 den Zellen und dem Gewebe hilft, mit der Stresssituation fertig zu werden. Die Mutation verleiht der Zelle einen kurzen proliferativen Vorteil und dadurch eine Anpassung an die karzinogenen Stoffen. Letztendlich endet dieser kurzfristige Vorteil der Zelle in der Progression der proliferativen Eigenschaft und somit in der Tumorentstehung. Sorlie identifizierte 2003 in Mammakarzinomen fünf Subtypen; alle fünf zeigten eine unterschiedliche Genexpression und hatten verschiedene TP53 Mutationen. Die Subtypen wurden jeweils in unterschiedlichen Tumorstadien gefunden, hatten unterschiedliche genetische und biologische Charakteristiken und wurden mit einem unterschiedlichen Verlauf der Krankheit assoziiert. Als Schlussfolgerung kann man sagen, dass die intrinsische Mutationsrate, der Verlust der Transaktivierungskapazität der verschiedenen Zielgene, und zu einem geringeren Anteil die dominant negativen Aktivitäten die führenden Kräfte repräsentieren, welche das Muster der TP53 Mutation bestimmen und den Phenotyp des Tumors beeinflussen.

1.7. Ki67

Das Ki67 Antigen ist ein Proliferationsmarker, d.h. es färbt die Zellen im Gewebe, die sich vermehren, die so genannte Wachstumsfraktion. Exprimiert wird Ki67 während des Zellzyklus in der G1-, S-, G2- und in der M-Phase. Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, in der Ruhephase, exprimieren das Ki67 Antigen nicht. Die immunhistochemische Färbung gibt Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren. Ki67 interagiert mit einem Antigen, das in den Zellkernen vorhanden ist. Dabei stellt sich das nukleoläre Antigen prädominant im nukleolären Kortex, in der Kernmatrix und in den dichten fibrillären Komponenten dar. Eine nukleoplasmäre Reaktivität konnte anhand von kleinen diskreten Strukturen festgestellt werden, wohingegen sich die Kernfärbung sehr heterogen darstellt (60).

Die Intensität der Expression von Ki67 während des Zellzyklus variiert ebenfalls. So kann man drei unterschiedliche Wege, die eine Zelle durchlaufen kann, differenzieren:

1. Der Ki67 stabile Weg. Hier handelt es sich um Zellen, bei denen Ki67 sichtbar während der M bis zur G1 Phase exprimiert wird. Die Zellkerne sind hier vergrößert.
2. Der Ki67 absteigende Weg. Hier wird Ki67 eher nukleolär exprimiert, um danach nicht mehr nachweisbar zu sein. Die Zellkerne sind in dieser Phase sehr klein.
3. Der Ki67 aufsteigende Weg. Hier kann man eine sehr intensive Markierung beobachten und die Zellkerne vergrößern sich.

Ki steht für Kiel und weist auf das Institut für Pathologie der Kieler Universitätsklinik hin. Der monoklonale Antikörper Ki67 wurde 1983 von Johannes Gerdes und dessen Kollegen zum ersten Mal beschrieben.

In den letzten Jahren hat sich die immunologische Färbung des Ki67 Antigens mittels Immunhistochemie etabliert. Es ist heutzutage eine schnelle und effiziente Methode zur Feststellung der sogenannten Wachstumsfraktion. Häufig wird der Ki67-Färbeindex zur Analyse herangezogen. Diesen kann man errechnen aus dem relativen Anteil der Ki67-positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl.

1.8. Die Immunhistochemie

Unter Immunhistochemie versteht man die histologische Darstellung immunologisch reaktiver Strukturen auf oder in Zellen bzw. Geweben nach Anwendung immunchemischer Verfahren, die durch Übertragung von Antikörpern-Farbkomplexen zu einer Anfärbbarkeit der entsprechenden antigentragenden Strukturen im histologischen Präparat führen (32).

Man unterscheidet zwei Arten von Antikörpern: mono- und polyklonale Antikörper. Der Vorteil der monoklonalen Antikörper ist eine hohe Spezifität, da monoklonale Antikörper nur ein Epitop des Antigens erkennen. Dadurch erhält man wenige falsche negative Ergebnisse. Wird jedoch dieses Epitop, wogegen sich der Antikörper richtet, während der Versuchsreihe vernichtet

beziehungsweise verändert, beispielsweise bei der Fixierung, kann man auch hier falsche negative Ergebnisse erhalten.

Es gibt zahlreiche immunhistochemische Nachweismethoden. Zum Beispiel die Avidin-Biotin-Komplex-Methode oder die Immunfluoreszenzmethode. Die von uns benutzte Avidin-Biotin-Komplex-Methode ist eine indirekte Detektionsmethode (s. Abb.1-1., S. 14). Indirekt, weil die primären Antikörper nicht direkt mit einem Marker versehen sind und deshalb über einen sekundären Antikörper, der gegen den primären gerichtet ist, im Gewebe „aufgespürt“ werden müssen. Dieser sekundäre Antikörper muss in einem weiteren Schritt mit einem Marker versehen werden. Diese Markierung wird für uns als eine schwarz-/ violett- Färbung sichtbar.

Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit 4 Bindungsstellen für Biotin.

Streptavidin ist eine auf gentechnischem Wege gewonnene Substanz, welche eine höhere Reinheit als Avidin aufweist und somit unspezifische Reaktionen verhindert. An dem sekundären mit Biotin versehenen Brückenantikörper bindet das Streptavidin-Peroxidase-Komplex. Die Peroxidase wird mit Hilfe des Substrates Diaminobenzidin detektiert. Bei der Umsetzung des Diaminobenzidins tritt eine charakteristische Färbung auf.

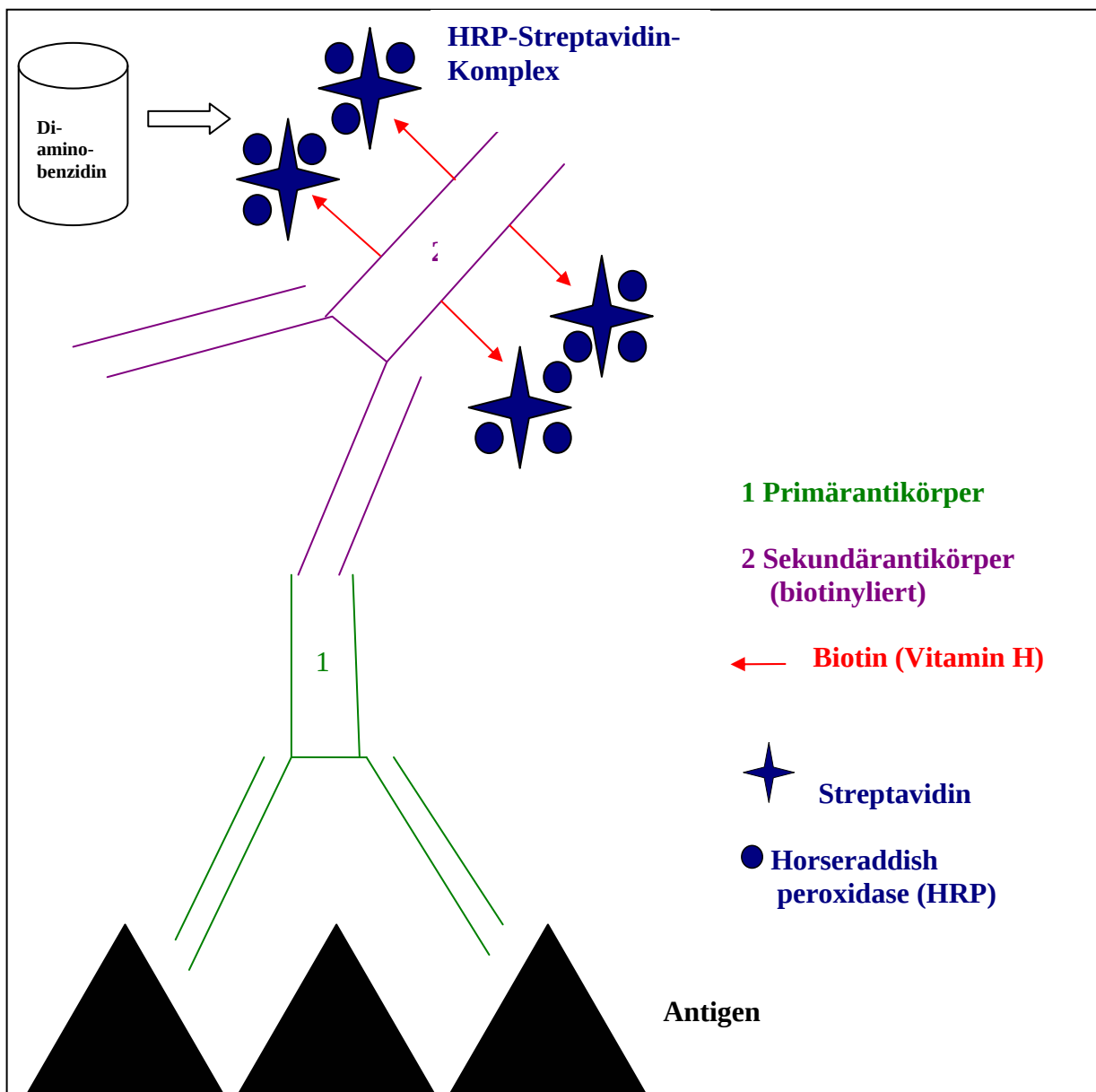


Abbildung 1-1. Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

Ein entscheidender Schritt in der Immunhistochemie ist die Antigendemaskierung.

Die Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes ist abhängig von der dreidimensionalen Struktur der Proteine; Antikörper erkennen spezifische Epitope, welche sich in einer bestimmten räumlichen Anordnung innerhalb des

Proteinmoleküls befinden. Die Antigendemaskierung führt zu einer Renaturierung oder partiellen Restauration der dreidimensionalen Struktur des Proteins und macht somit die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes wieder möglich.

Um die durch die Formalinlösung „maskierten“ Antigene freilegen zu können und dadurch erst eine Markierung zu ermöglichen, gibt es zwei Methoden: die enzymatische Demaskierung, z.B. mit Trypsin, und die hitzeinduzierte Demaskierung (46). Diese zwei Demaskierungsmethoden können auch kombiniert werden. Das ausgedehnte Waschen des in Formalin fixierten Gewebes führt durch die Rehydrierung zum Wiedererlangen der Immunreaktivität (45). Citrat als ein Calciumchelator spielt ebenfalls eine Rolle in der Freilegung der gewünschten Antigenepitope (46).

Als weiterer entscheidender Schritt der Avidin-Biotin-Komplex-Methode ist die Hemmung der endogenen Enzymaktivität. Die endogene Peroxidase wird genau wie die Peroxidase aus dem HRP-Komplex, welche an den biotinylierten Sekundärantikörper gebunden ist, mit Hilfe des Substrates DAB (Diaminobenzidine) detektiert. Hierbei tritt die charakteristische Färbung auf. Um falsche positive Ergebnisse zu vermeiden, ist es wichtig, die endogene Peroxidase zu hemmen. Die endogene Peroxidase findet sich hauptsächlich in Erythrozyten, Granulozyten und Mastzellen. Ist die Blockierung erfolgreich, erscheinen die Erythrozyten im fertigen Präparat farblos.

Ebenfalls von Bedeutung sind die Kontrollen in der Immunhistochemie. Es gibt positive und negative Kontrollen.

Unter positiven Kontrollen versteht man die Immunhistochemie an einem Gewebepreparat, das das zu detektierende Antigen enthält. Somit kann man bei spezifischen Färbeargebnissen sicherstellen, dass die Immunhistochemie einwandfrei durchgeführt wird und das richtige Detektionssystem und der richtige Antikörper benutzt wurden.

Negative Kontrollen sind wichtig, um unspezifische Reaktionen eines Primärantikörpers oder des Detektionssystems mit dem Gewebe aufzudecken. Negative Kontrollen bezüglich des Primärantikörpers werden durchgeführt, indem bei einer Immunhistochemie Gewebeschnitte mitgeführt werden, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert werden. Die anderen Schritte der Versuchsreihe bleiben gleich. Findet man nach Beendigung der Versuchsreihe

auf dem Kontrollgewebe ein Farbsignal, handelt es sich um eine unspezifische Reaktion, welche bei der Auswertung in Betracht gezogen werden muss, um keine falschen positiven Ergebnisse zu erhalten.

2. Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Untersuchung war es, die klinischen und histopathologischen Daten der Patientenpopulation, die an einem Harnblasenkarzinom erkrankten und die zwischen 1987 und 1991 in der Urologischen Klinik des Marienhospitals Herne, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum zystektomiert wurden, mit den Daten aus den immunhistochemischen Untersuchungen mit den Markern Ki67 und p53 dieser Tumoren in Beziehung zu setzen.

Die Patientendaten umfassen das Alter und Geschlecht der Patienten, die histologische Untersuchung des Tumors, das Tumorstadium, den Lymphknotenstatus, den Differenzierungsgrad der Tumoren und ob der Tumor zum Zeitpunkt der Operation schon metastasiert war.

Dadurch sollten folgende Fragen beantwortet werden:

Gibt es Zusammenhänge zwischen dem Ki67 –Index (der Anteil der Ki67-positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl) und dem Tumorstadium, dem Grading und dem Lymphknotenbefall?

Ist es möglich, zwischen der optischen Dichte der Ki67-positiv gefärbten Tumorzellkerne und dem Tumorstadium, dem Grading und dem Lymphknotenbefall einen Zusammenhang herzustellen?

Gibt es Zusammenhänge zwischen der Anzahl der p53 markierten Zellkerne in Prozent und dem Tumorstadium, dem Differenzierungsgrad des Tumors und dem Lymphknotenbefall?

Kann man zwischen der optischen Dichte der p53 positiv gefärbten Tumorzellkerne und dem Tumorstadium, dem Tumorgrading und dem Lymphknotenbefall einen Zusammenhang herstellen?

3. Material und Methoden

3.1. Material

Zwischen 1987 und 1990 erfolgte bei 120 Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase eine radikale Zystektomie in der Urologischen Klinik des Marienhospitals Herne, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum.

Die Proben wurden mit 4% Formalin fixiert und in Paraplast eingedeckt.

Aus diesen Proben wurden 4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf 0,05% Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen und anschließend bei Zimmertemperatur getrocknet.

Von jeder Probe wurde ein Präparat mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt um sicherzustellen, dass das verwendete Gewebe tatsächlich Harnblasengewebe ist und dass die angeschnittene Probe tatsächlich Tumorgewebe enthält.

Wegen der schlechten Konservierung kam es dazu, dass einige Proben unbrauchbar wurden.

Es blieben 103, davon 24 Frauen und 79 Männer.

Als Kontrolle ist tumorfreies Harnblasengewebe verwendet worden (K8 und K11).

3.2. Verwendete Reagenzien, Labormaterialien und Geräte

3.2.1. Reagenzien

- Antikörper: primäre: Anti-Ki-67 (Ki-S5), Formalin grade
 Monoklonaler Antikörper gegen das Ki-67 Antigen
 Vom: mouse mouse hybrid cells
 Verdünnung: 1:50
 Bezugsquelle: Firma Boehringer, Mannheim

 Anti-p53, clone BP53-12
 Monoclonale mouse IgG2a
 Verdünnung: 1:350
 Bezugsquelle: Firma Upstate
- sekundäre: Biotinilated Goat Anti-mouse Immunoglobulins
 Verdünnung: 1:400
 Bezugsquelle: Firma Dako
- Ammoniumchlorid (NH₄CL)
 Bezugsquelle: Firma Sigma Chemicals, Deisenhofen
- β-D-Gucose
 Bezugsquelle: Firma Sigma
- Citronensäure (wasserfrei, gepulvert reinst)
 Bezugsquelle: Firma Merck, Darmstadt
- Diaminobenzidine (DAB)
 Bezugsquelle: Firma Sigma

- Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat
Bezugsquelle: Firma Merck, Darmstadt
- Ethanol (C₂H₅OH)
Bezugsquelle: Firma J.T. Baker
- Eukitt
Bezugsquelle: Firma: Riedel De Haen
- Glucoseoxidase
Bezugsquelle: Firma Sigma Chemikals, Deisenhofen
- Methanol (CH₃OH M=32,04g/mol)
Bezugsquelle: Firma "Baker" Grade
- Natriumchlorid (NaCl)
Bezugsquelle: Firma Merck, Darmstadt
- Natriumcitrat (tri-Natriumcitrat-Dihydrat)
Bezugsquelle: Firma Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphatmonohydrat
Bezugsquelle: Firma Fluka
- Natronlauge (NaOH) 1mol/l
Bezugsquelle: Firma Merck
- Nickel-II-Sulfat (NiSO₄)
Bezugsquelle: Firma Sigma
- Poly-L-Lysine Hydrobromid
Bezugsquelle: Firma Sigma
- Rinderalbumin (BSA)

Bezugsquelle: Firma Sigma

- Salzsäure (HCl) 1mol/l

Bezugsquelle: Firma Roth

- Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex (HRP) RPN 1051

Verdünnung: 1:50

Bezugsquelle: Firma Amersham

- Trishydroxymethylaminomethan (TBS)

Bezugsquelle: Firma Merck

- Triton X-100

Bezugsquelle: Firma Merck

- Wasserstoffperoxyd (H₂O₂) 30%

Bezugsquelle: Firma Fluka

- Xylol

Bezugsquelle: Firma Merck

3.2.1. Labormaterialien

- Bechergläser

- Reagenzgläser

- Messzylinder

- Röhrchen

- Einmalpipetten

- Papierfilter
- Pipettenspitzen für automatische Pipetten
- Zellstoff
- Handschuhe
- Pap-Pen für Immuno
Bezugsquelle: Firma Sigma
- Feuchtkammer

3.2.3. Geräte

- Analysewaage
Bezugsquelle Firma: Sartorius
- Grobwaage
Bezugsquelle Firma: Sartorius
- Kühl-Gefrierkombination
Bezugsquelle Firma: Bosch
- Durchlichtmikroskop
Bezugsquelle Firma Carl-Zeiss (Modell III RS), Göttingen
- Durchlichtmikroskop
Bezugsquelle Firma: Hund Wetzlar
- Mikrozentrifuge
Bezugsquelle Firma Beckmann

- PH-Meter

Bezugsquelle Firma: Metrohm

- Pipetten

Bezugsquelle: Firma Eppendorf (Varipette 4710), Hamburg.

- Refrigerated Incubator Shaker

Bezugsquelle Firma: Inn Ova 4230

- Rocker Plattform

Bezugsquelle Firma: Bellco Glass. Inc. Vineland, New Jersey

- Rührheizplatte

Bezugsquelle Firma: Ika Labortechnik

- Saugpumpe

Bezugsquelle Firma: EMS medical (Vacumat 100)

- Shaker

Bezugsquelle Firma: Cenco Inst.

3.3. Zubereitung der benötigten Pufferlösungen, Detergenzien und Stringenzien

- 0,05 M TBS

6,06g Trishydroxymethylaminomethane in 500 ml Aqua dest. lösen und 8,77g NaCl (150 mM) dazugeben. Mit 1N HCl ein pH von 7,6 einstellen und mit Aqua dest. bis 1000 ml auffüllen. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Citratpufferlösung pH 6

Die Citratpufferlösung setzt sich aus 9 ml Lösung A, 41 ml Lösung B und 450 ml Aqua dest. zusammen.

Für Lösung A löst man 21,01g 0,1 Molare Citronensäure in ein Liter Aqua dest. auf.

Für Lösung B löst man 29,4g Natriumcitrat auch 0,1 M in ein Liter Aqua dest. auf.

- Phosphat-Puffer (PB) pH 7,4

Stammlösung 0,2mol/l:

28,8g Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat und 5,2g

Natriumhydrogenphosphatmonohydrat löst man in ein Liter Aqua bidest. Auf.

Gebrauchslösung 0,1 mol/l:

Die Stammlösung 1:2 mit Aqua dest. verdünnen und auf PH 7,4 mit 1N NaOH einstellen.

- Diaminobenzidine (DAB)-Lösung

5000 mg DAB in 100 ml Aqua dest. lösen.

- Glucoseoxidase

1,2 mg Glukoseoxidase in 1 ml Aqua dest.

- NiSO₄ X 6H₂O

130 mg Nickelsulfat in 10 ml Aqua dest.

- NH₄Cl

4000 mg Ammoniumchlorid in 100 ml Aqua dest.

3.4. Einleitende Maßnahmen

Die Präparate sind zuerst entparaffiniert worden, indem sie 10 Minuten in ein Xylolbad gestellt wurden.

Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, jeweils 5 Minuten in 100% Alkohol, 96% Alkohol und 70% Alkohol.

Die Rehydrierung ist eine wichtige Maßnahme für die weitere Bearbeitung der Präparate, aber vor allem für die Antigendemaskierung (46). Um eine bessere Rehydrierung zu erzielen, wurden die in Parafin eingelegten histologischen Gewebeschnitten für zusätzliche drei bis vier Minuten in 70% Alkohol eingetaucht.

Die Antigendemaskierung wurde nach der Rehydrierung weitergeführt mit einem Citratpufferbad bei einem pH von sechs und einer Temperatur von 60 Grad Celsius im Brutschrank für ungefähr 16 Stunden.

Danach wurden die Objektträger auf Zimmertemperatur in einer Feuchtkammer abgekühlt (30 Minuten). Jedes einzelne Präparat wird sorgfältig mit einem Fettstift eingerahmt, um das Auslaufen der ab jetzt nachträglich aufgetragenen Reagenzien zu verhindern. Dabei muss man beachten, dass die Fläche, auf der man den Fettstift aufträgt, trocken sein soll und das Gewebe trotzdem immer feucht bleibt. Um das Austrocknen und das Verdunsten der Reagenzien zu verhindern, werden die darauf folgenden Schritte in einer Feuchtkammer durchgeführt. Das Harnblasengewebe wird mit 0,05 M TBS-Puffer drei mal 10 Minuten gespült.

3.5. Versuchsmethodik

Für jeden Patienten wurde pro Antikörper ein Präparat angefertigt.

Bei jeder Versuchsreihe wurden sowohl Kontrollen mit tumorfreiem Harnblasengewebe als auch eine immunhistochemische Kontrolle (ICH-Kontrollen) durchgeführt. Die IHC-Kontrollen bleiben negativ, da sie nicht mit dem primären Antikörper inkubiert werden.

Um falsche positive Ergebnisse zu verhindern, muss die Aktivität der endogenen Peroxidase im Gewebe gehemmt werden. Das endogene Enzym setzt genau wie das Enzym des Detektionssystems das Chromogen DAB um.

Die endogene Peroxidase wird durch die Inkubationszeit von 20 Minuten mit Wasserstoffperoxid und Methanol (200 ml Methanol + 50 ml 3% Wasserstoffperoxid) gehemmt.

Nach einem Waschschrift von zwei mal 10 Minuten mit TBS-Puffer wird mittels Triton X, einen Detergent, die Zellmembran des Gewebes durchlässiger gemacht. Durch die Bindung der Aldehydgruppen an das Ammoniumchlorid wird der Hintergrund neutralisiert.

Dazu benötigt man: 0,59 g Ammoniumchlorid + 50 µl Triton X + 20 ml TBS.

Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten.

Es folgt ein Waschschrift von zwei mal 10 Minuten TBS-Puffer.

Der nächste Schritt ist die Inkubation mit 5% BSA (5 g Rinderalbumin in 100 ml TBS aufgelöst auf der Rüttelplatte) für die Dauer von einer Stunde. Damit wird die Ladungsneutralisation des Gewebes bezweckt.

Vor dem pipettieren des Antikörpers auf das Gewebe muss das 5% BSA gründlich abgesaugt werden, um die optimale Verdünnung des Antikörpers zu erhalten.

Der primäre Antikörper wird für kurze Zeit vor dem Gebrauch zentrifugiert und danach in 0,8% BSA (Bovines Serum Albumin) verdünnt. Die Verdünnung ist je nach Antikörper verschieden. Für Ki67 wurde eine Verdünnung von 1:50 gebraucht. Für p53 war die Verdünnung 1:350.

Für einen Gewebeschnitt rechnet man 300 µl Flüssigkeit.

Die Präparate werden dann zusammen mit der Feuchtkammer in den Kühlschrank gestellt und bei 4° C über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert.

Auf den IHC Kontrollen wird nur 0,8% BSA-Lösung pipettiert.

Am zweiten Tag folgt nach vier mal 10 Minuten waschen mit TBS-Puffer die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dieser wird in TBS-Puffer verdünnt (1:400).

Es folgen vier mal 10 Minuten waschen mit TBS-Puffer.

An den biotinmarkierten Sekundärantikörper bindet sich nun der Horseradisch-Peroxidase-Streptavidin-Komplex (HRP), welcher in einer Verdünnung von 1:150 in TBS-Puffer angesetzt wird.

Die Gewebeproben werden damit für eine Stunde inkubiert.

Vor dem Nachweis der Peroxidase wird das Harnblasengewebe mit TBS-Puffer für 4 mal 10 Minuten gründlich gewaschen.

Die Farbstofflösung für die Avidin-Biotin-Komplex-Methode wird durch das Mischen der folgenden Substanzen angefertigt:

15ml 0,1 mol Phosphatpuffer

150µl 3,3-Diaminobenzidin-Lösung

150µl NH₄Cl

300µl NiSO₄

300µl 10%Glucose

50µl Glucoseoxidase.

Der Ansatz muß filtriert werden und ist nur 40 Minuten haltbar.

Das Gewebe wird mit der Substratlösung bei Raumtemperatur unter lichtmikroskopischer Kontrolle inkubiert.

Der Farbstoff DAB (3,3-Diaminobenzidin) erscheint im Lichtmikroskop violett. Später ändert sich die Farbe in schwarz.

Die Entwicklungszeit ist für jeden Antikörper unterschiedlich und kann kleine Variationen aufweisen, die versuchsbedingt sind.

Die Entwicklungszeit für Anti-p53 betrug im Durchschnitt ungefähr 20 Minuten und für Anti-Ki-67 im Durchschnitt 45 Minuten.

Die Reaktion wird gestoppt durch die Aufpipettierung von TBS-Puffer.

Die überschüssige Farbstofflösung wird durch 2 mal 10 Minuten Waschen mit TBS-Puffer gründlich ausgespült, um eine weitere Einwirkung der Lösung zu verhindern.

Während der Arbeit mit der Entwicklungslösung sollte man unbedingt Gifthandschuhe tragen, weil die Substanz hochgiftig ist.

Die Präparate werden haltbar gemacht, indem sie entwässert und danach in Eukitt eingedeckt werden.

3.6. Auswertung am Lichtmikroskop

Die Präparate wurden am HUND Lichtmikroskop ausgewertet. Für die beiden Marker p53 und Ki67 wurde das gleiche Auswertungsschema benutzt.

Die Präparate wurden mit dem 10er Objektiv auf eine spezifische-Markierung mit dem chromogen Diaminobenzidin durchsucht. Hat man eine Markierung gefunden, wurde im markierten Feld eine repräsentative Stelle für das jeweilige Präparat ausgesucht. Als repräsentative Stelle gilt eine Stelle mit Tumorzellen, welche von der Intensität der Markierung für das gesamte Präparat repräsentativ ist. Im 40er Objektiv habe ich nun die Gesamtzahl der Tumorzellkerne auf einem halben Gesichtsfeld gezählt und danach die markierten Tumorzellkerne auf dem gleichen Gesichtsfeld.

Die Intensität der Kernmarkierung wurde bewertet auf einer Skala von null bis drei. Null bedeutet keine Markierung, eins eine schwache Markierung, zwei eine gute und drei eine sehr gute Markierung. Die Intensität der Markierung wurde von dem gesamten markierten Feld festgestellt.

3.7. Statistik

Die Patientendaten wurden retrospektiv mit Hilfe der Patientenakten zusammengestellt. Die Daten umfassen Alter, Geschlecht, histopatologische Untersuchung des Tumors, das TNM-Stadium und das Operationsdatum.

Die Korrelation der Patientendaten mit den immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS Version 13. Es wurden die Mittelwerte für den Ki67-Index und den p53-Index erstellt, aufgeteilt nach Tumorstadium, Tumorgrading und Lymphknotenstatus. Davon wurden Boxplots erstellt.

Es wurden für die Ki67 und p53 Indices die Korrelationen jeweils mit dem Tumorstadium, Tumorgrading und Lymphknotenstatus erstellt und Signifikanzen ausgerechnet.

Um die Intensität der markierten Präparate mit dem Ki67- und p53-Antigen in Verbindung mit dem Tumorstadium, dem Tumorgrading und dem Lymphknotenstatus zu stellen, wurden Kreuztabellen erstellt mit Berechnungen des Chi-Quadrat-Tests und Berechnungen des Spearmanschen Korrelationskoeffizienten. Aus den Kreuztabellen wurden Balkendiagramme erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Immunhistochemische Ergebnisse

Die immunhistochemisch gewonnenen Daten für die Kernmarker Ki67 und p53 sind in Tabelle 7-1. gelistet (siehe Anhang).

Für beide Antikörper wurde eine gute Markierung erzielt.

Bilder von der Markierung mit dem Antikörper Ki67.

Präparatnummer 18522KII/88: (Abbildung 4-1 und 4-2)

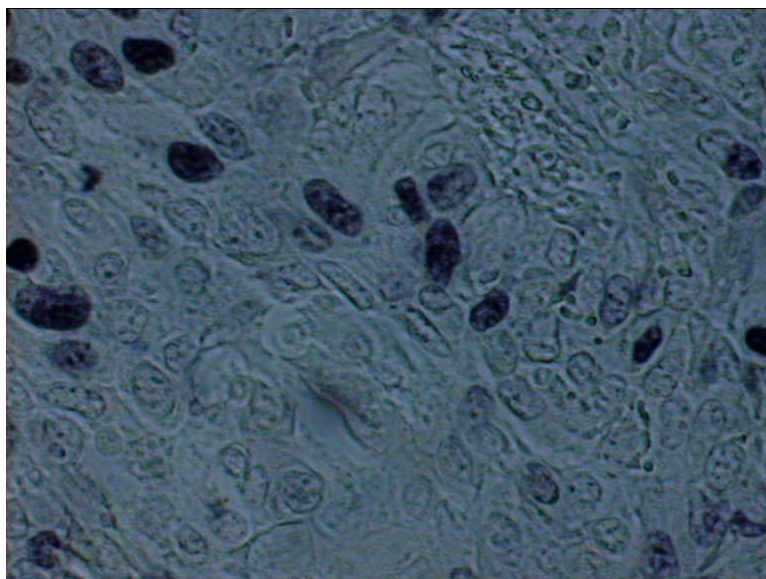


Abbildung 4-1. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Urothelkarzinom. Immunhistochemische Färbung. Vergrößerung: Objektiv 40.

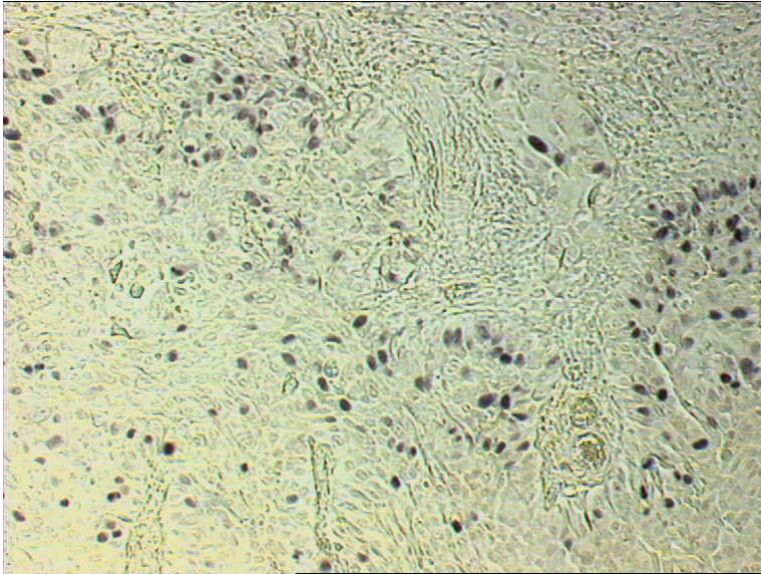


Abbildung 4-2. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Urothelkarzinom. Immunhistochemische Färbung. Vergrößerung: Objektiv 10.

Bilder von der Markierung mit dem Antikörper p53.

Präparatnummer 7455lih/88: (Abbildung 4-3. und 4-4.)

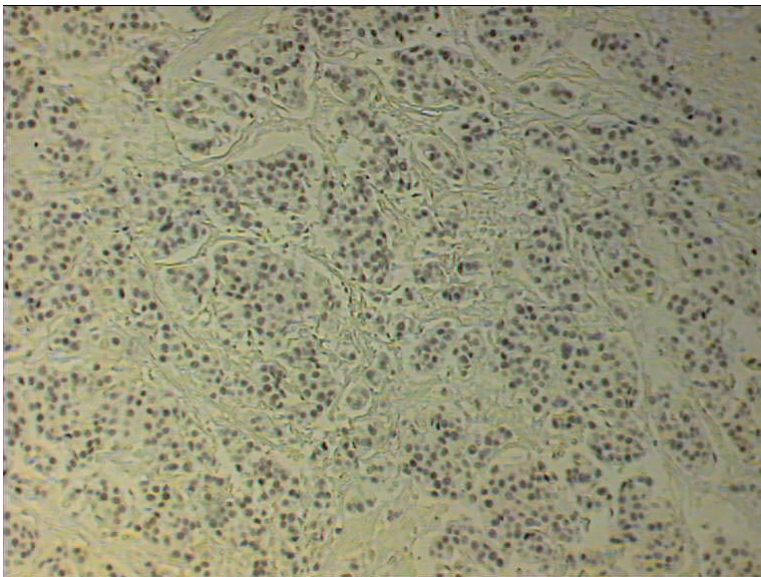


Abbildung 4-3. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären p53 Expression im Urothelkarzinom. Immunhistochemische Färbung. Vergrößerung: Objektiv 10.

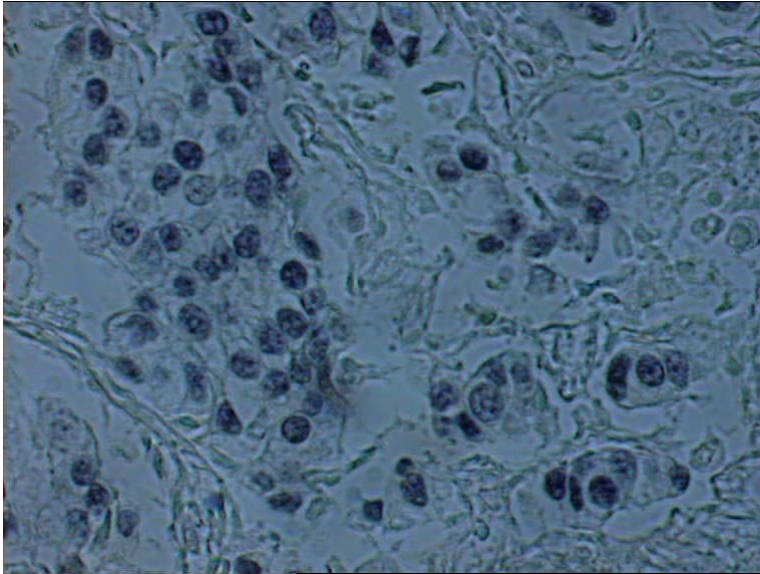


Abbildung 4-4. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären p53 Expression im Urothelkarzinom. Immunhistochemische Färbung. Vergrößerung: Objektiv 40.

Eine Markierung auf dem Kontrollgewebe wurde nicht gefunden. Mit dem Antikörper p53 sind 45,6% der Präparate markiert. Mit dem Antikörper Ki67 konnte ich 46,6% der Präparate markieren. Die Intensität variierte von schwach (Markierung 1) über mäßig (Markierung 2) bis stark (Markierung 3) für beide Antikörper.

Für Ki 67 sind von den 48 positiven Gewebeproben 11 mit einer schwachen Markierung, 25 mit einer mäßigen und 12 mit einer starken Markierung.

Für p53 sind von den 47 positiven Gewebeproben 8 mit einer schwachen Markierung, 20 mit einer mäßigen und 19 mit einer starken Markierung.

Für die statistische Auswertung wurden 88 Patienten verwendet, bei denen der Datensatz vollständig war.

In der Tabelle 4-1. und 4-2. sind die Häufigkeiten der unterschiedlichen Intensitäten (0-3) der Markierung mit Ki67 und p53 aufgelistet. Auffällig ist, dass ein großer Teil der Tumoren keinerlei Markierung (Markierung 0) für p53 (53,4%) und Ki67 (52,3%) zeigt.

p53_Intensität

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	47	53,4	53,4	53,4
	1	7	8,0	8,0	61,4
	2	17	19,3	19,3	80,7
	3	17	19,3	19,3	100,0
	Gesamt	88	100,0	100,0	

Tabelle 4-1.

Ki67_Intensität

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	46	52,3	52,3	52,3
	1	8	9,1	9,1	61,4
	2	25	28,4	28,4	89,8
	3	9	10,2	10,2	100,0
	Gesamt	88	100,0	100,0	

Tabelle 4-2.

Beispiel für ein nicht markiertes Präparat mit Ki67 (Markierung 0) Objektiv 40
 Präparatnummer 13883IIIc89 (Abbildung 4-5.) :

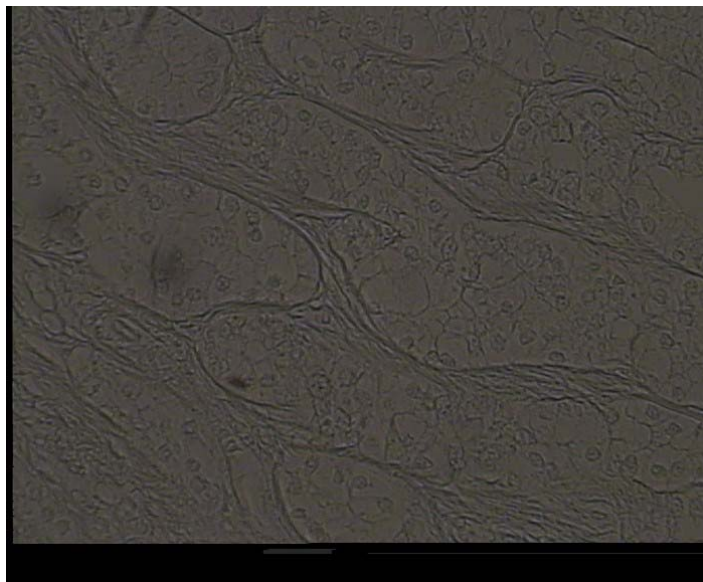


Abbildung 4-5. Lichtmikroskopische Darstellung einer Immunhistochemischen Färbung am Harnblasenkarzinom. Hier zeigt sich keine nukleäre Ki67 Expression.

Beispiel für ein schwach markiertes Präparat mit Ki 67 (Markierung 1) Objektiv 40 Präparatnummer 15635lv88 (Abbildung 4-6.):

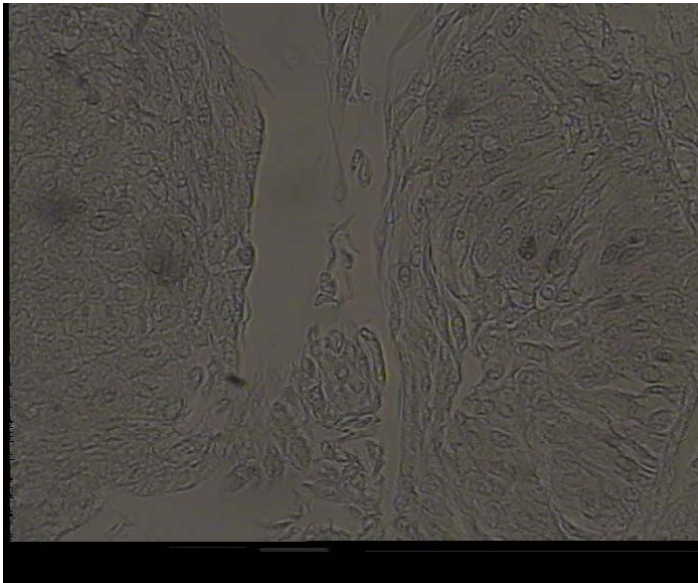


Abbildung 4-6. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Harnblasenkarzinom. Schwache Intensität der Kernmarkierung.

Beispiel für ein stark markiertes Präparat mit Ki 67 (Markierung 2) Objektiv 40 Präparatnummer 28091IIIi90 (Abbildung 4-7.):

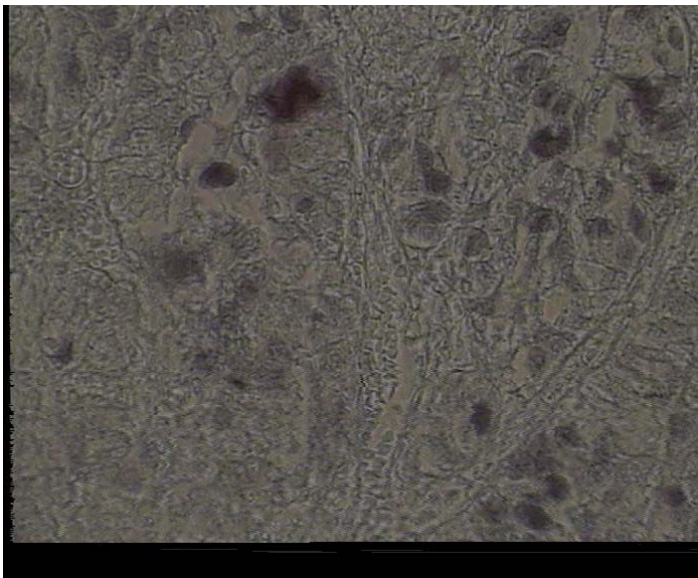


Abbildung 4-7. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Harnblasenkarzinom. Starke Intensität der Kernmarkierung.

Beispiel für eine sehr starke Markierung mit Ki 67 (Markierung 3) Objektiv 40 Präparatnummer 1226IIIIm 89 (Abbildung 4-8.):

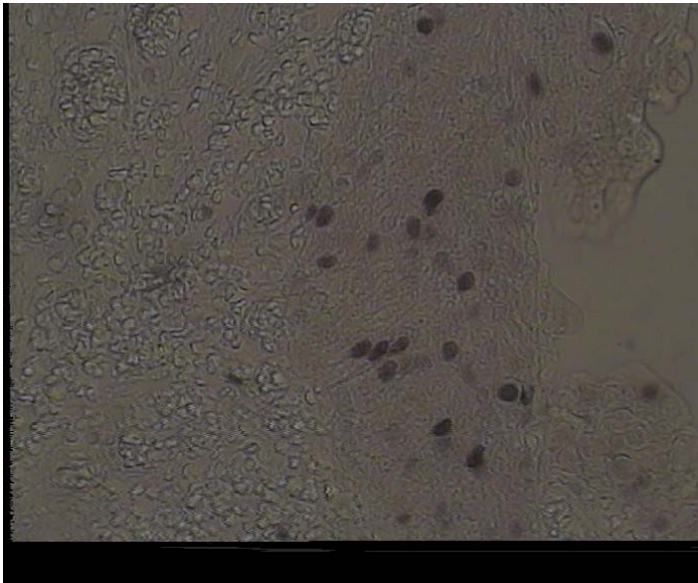


Abbildung 4-8. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Harnblasenkarzinom. Sehr starke Intensität der Kernmarkierung.

Beispiel für ein Präparat, das keine Markierung mit dem Antikörper p53 zeigt (Markierung 0) Objektiv 40 Präparatnummer 123fvg91 (Abbildung 4-9.):

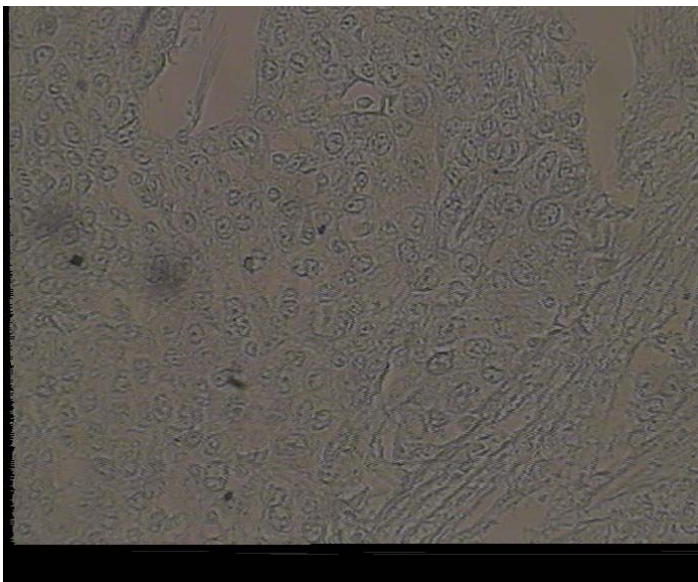


Abbildung 4-9. Lichtmikroskopische Darstellung einer Immunhistochemischen Färbung am Harnblasenkarzinom. Hier zeigt sich keine nukleäre p53 Expression. Vergrößerung: Objektiv 40.

Beispiel für eine schwache Markierung mit dem Antikörper p35 (Markierung 1)
Objektiv 40 Präparatnummer 33393oij 89 (Abbildung 4-10.):



Abbildung 4-10. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Harnblasenkarzinom. Schwache Intensität der Kernmarkierung.

Beispiel für eine starke Markierung mit dem Antikörper p35 (Markierung 2)
Objektiv 40 Präparatnummer 17888VleE87 (Abbildung 4-11.):

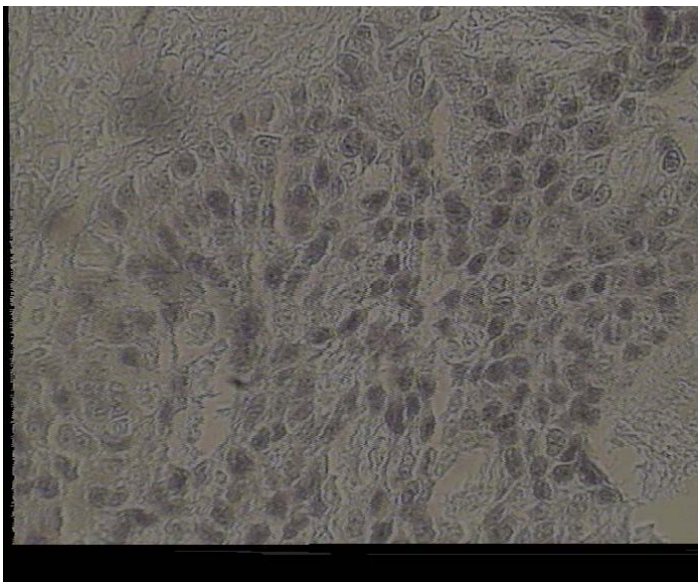


Abbildung 4-11. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Harnblasenkarzinom. Starke Intensität der Kernmarkierung.

Beispiel für eine sehr starke Markierung mit dem Antikörper p35 (Markierung 3)
Objektiv 40 Präparatnummer 28091IIIi90 (Abbildung 4-12.):

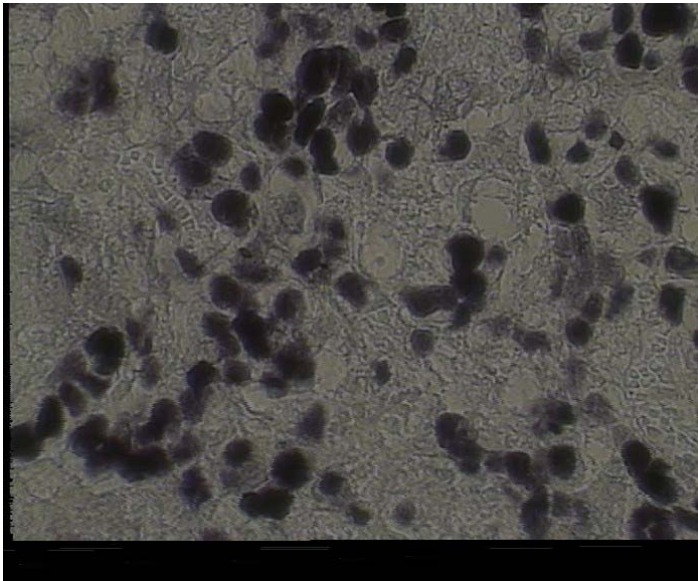


Abbildung 4-12. Lichtmikroskopische Darstellung der nukleären Ki67 Expression im Harnblasenkarzinom. Sehr starke Intensität der Kernmarkierung.

4.2. Statistische Ergebnisse

Tabellarische Anordnung der Patientendaten (siehe Anhang).

4.2.1. Alter und Geschlechtsverteilung

Das Patientengut setzt sich aus 65 Männern (73,9 %) und 23 Frauen (26,1 %) zusammen. Das durchschnittliche Alter lag bei den Männern bei 63,4 Jahren, wobei das Alter des jüngsten Patienten 41 Jahre betrug und das des ältesten Patienten 84 Jahre betrug. Die weiblichen Patienten hatten ein mittleres Alter von 64 Jahren. Die Spanne erstreckte sich von 45 Jahren bis 82 Jahren. Vollständige Datensätze wurden nur von 88 Patienten erhoben. Somit fließen die restlichen 15 Patienten nicht in die statistische Auswertung ein.

4.2.2. Auswertung des Tumorstadiums (T) der untersuchten Harnblasenkarzinome

Ein T1 Stadium, eine Infiltration des subepithelialen Bindegewebes, zeigten 10 Patienten (11,4%). 25 Patienten (28,4%) hatten ein T2 Stadium, hier war die Muskularis propria infiltriert. Eine Infiltration über der Muskularis hinaus, ein T3 Stadium, war bei 45 Patienten festzustellen, dies entspricht 51,1%. Nur 8 Patienten (9,1%) zeigten ein T4 Stadium mit Infiltration der umliegenden Organe. Insgesamt sind es 88 Patienten, deren Datensätze in die Statistik einbezogen wurden. Die restlichen 15 Patienten scheiden wegen unvollständiger Datensätze aus der Statistik aus.

Die Tabelle 4-3. zeigt die Aufteilung der Häufigkeiten der jeweiligen Tumorstadien. Hier kann man eine hohe Anzahl an pT2 und pT3 Tumoren beobachten.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	pT1	10	11,4	11,4	11,4
	pT2	25	28,4	28,4	39,8
	pT3	45	51,1	51,1	90,9
	pT4	8	9,1	9,1	100,0
	Gesamt	88	100,0	100,0	

Tabelle 4-3.

4.2.3. Lymphknotenbeteiligung (N)

Bei 74 Patienten (87,06%) konnten keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Fünf Patienten (5,88%) hatten das Lymphknotenstadium N1. Dies entspricht einer Infiltration einzelner Lymphknoten bis 2 cm Größe. Bei 6 Erkrankten (7,06%) trat das Lymphknotenstadium N2 auf. N2 entspricht der Infiltration einzelner oder multipler bis 5 cm großer Lymphknoten.

In die Statistik fließen auch hier nur die 88 Patienten mit vollständigem

Datensatz.

Die Tabelle 4-4. zeigt die Aufteilung der Häufigkeiten der jeweiligen Lymphknotenstadien.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	N0	71	80,7	86,6	86,6
	N1	5	5,7	6,1	92,7
	N2	6	6,8	7,3	100,0
	Gesamt	82	93,2	100,0	
Fehlend	9	6	6,8		
Gesamt		88	100,0		

Tabelle 4-4.

4.2.4. Auftreten von Fernmetastasen (M)

Die Beurteilung der Fernmetastasen ergab bei allen Patienten kein Anzeichen für eine Fernmetastase. Von 19 Patienten konnten keine Angaben evaluiert werden.

4.2.5. Differenzierungsgrad der untersuchten Karzinome (G)

In vier Fällen (4,44%) trat eine gute Differenzierung des Tumors auf (G1). Eine mäßige Differenzierung des Tumors trat bei 35 Patienten auf (38,88%). Schlecht differenzierte Tumore zeigten 51 Patienten (56,66%). Von 14 Patienten waren keine Daten vorhanden.

In die Statistik fließen hier ebenfalls nur die 88 Patienten mit vollständigem Datensatz ein.

Die Tabelle 4-5. zeigt die Aufteilung der Häufigkeiten des jeweiligen Gradingstadiums des Tumors. Hier kann man eine hohe Anzahl an G2 und G3-Tumoren erkennen.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	G1	3	3,4	3,4	3,4
	G2	35	39,8	40,2	43,7
	G3	49	55,7	56,3	100,0
	Gesamt	87	98,9	100,0	
Fehlend	9	1	1,1		
Gesamt		88	100,0		

Tabelle 4-5.

4.3. Statistische Auswertungen der Ki67 und p53-Indices im Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors, dem Tumorstadiums und Lymphknotenstatus

4.3.1. Mittelwerte für den p53 und Ki67-Färbeindex, aufgeteilt nach dem Differenzierungsgrad des Tumors (G)

Um einen statistischen Zusammenhang zwischen dem p53-Färbeindex bzw. dem Ki67-Färbeindex und dem Differenzierungsgrad des Tumors (G1-3) zu finden, wurden zuerst die Mittelwerte für den p53-Färbeindex bzw. Ki67-Färbeindex erstellt, aufgeteilt nach dem Differenzierungsgrad des Tumors (Grading). (Tabelle 4-6., 4-7., und 4-8.)

Aufgeteilt nach Tumorgrading, zeigen die Mittelwerte für den **p53-Färbeindex** bzw. **Ki67-Färbeindex** ein einheitliches Bild. Mit steigendem Grading sind beide Indizes ebenfalls erhöht.

G = 1

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	3	,00	2,86	1,0833	1,55095
Ki67_index	3	,00	3,88	1,2933	2,24012
Gültige Werte (Listenweise)	3				

Tabelle 4-6.

G = 2

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	35	,00	78,90	8,8431	18,62631
Ki67_index	35	,00	17,39	3,2240	5,00749
Gültige Werte (Listenweise)	35				

Tabelle 4-7.

G = 3

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	49	,00	89,57	21,2227	27,01749
Ki67_index	49	,00	47,89	6,4139	10,39704
Gültige Werte (Listenweise)	49				

Tabelle 4-8.

4.3.2. Zusammenhang zwischen dem p53 –Färbeindex und dem Grading des Tumors

In Abbildung 4-13. stellt sich der Zusammenhang zwischen dem relativen Anteil der p53 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtumorzellkernzahl in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (G) des Tumors anhand eines Boxplotdiagrammes dar. Boxplotdiagramme stellen schematisch die Häufigkeitsverteilung dar und sind dazu geeignet, mehrere Verteilungen miteinander zu vergleichen.

In Abbildung 4-13. kann man ein deutliches Ergebnis sehen. Mit steigendem Grading steigt auch der relative Anteil an p53 positiv gefärbten Zellkernen. Da nur ein Patient im Gradingstadium vier (anaplastisch) eingestuft wurde, habe ich diesen bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

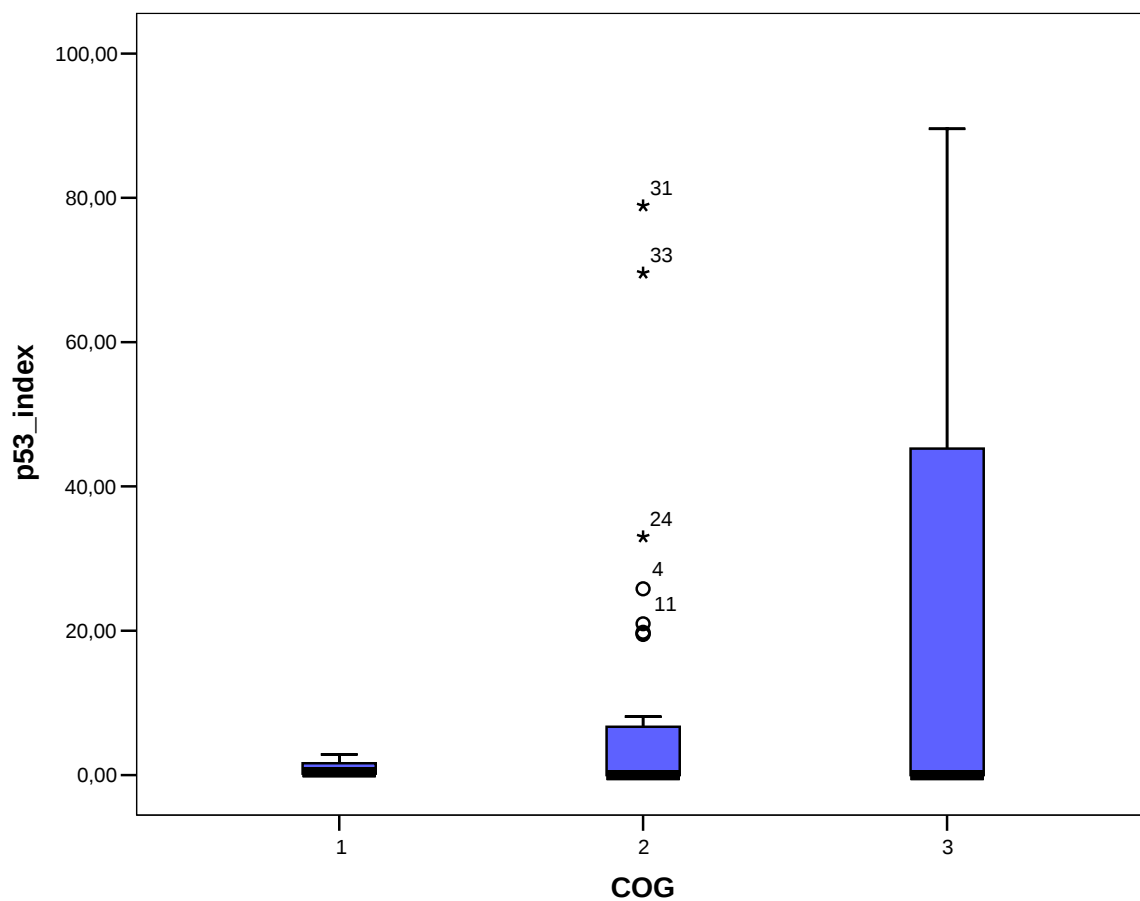


Abbildung 4-13. Relativer Anteil der p53-positiven Zellkerne an der Gesamtumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Differenzierungsgrad G. Die mit Kreisen bzw. Sternen markierten Zahlen (Datensatznummern) sind Ausreißer bzw. Extremfälle.

4.3.3. Zusammenhang zwischen dem Ki67 –Färbeindex und dem Grading des Tumors

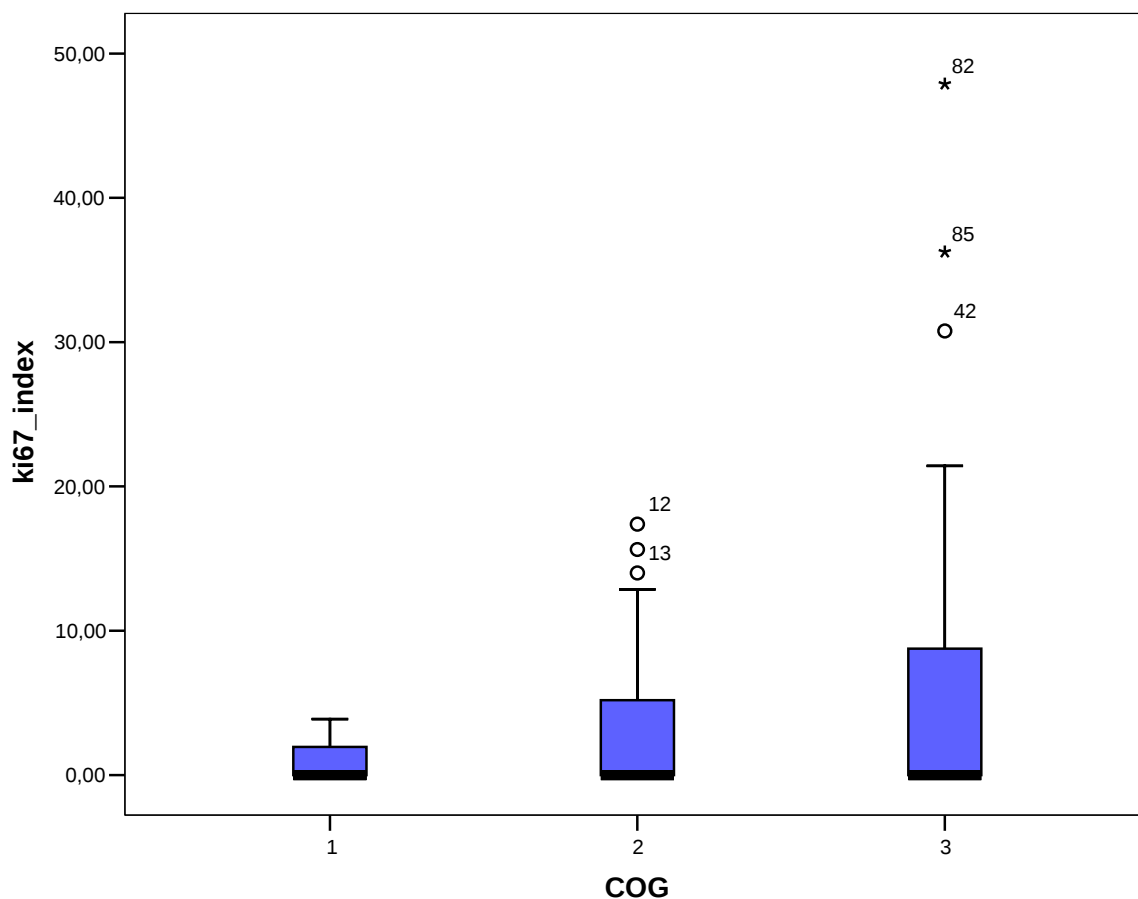


Abbildung 4-14. Relativer Anteil der Ki67-positiven Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Differenzierungsgrad G. Die mit Kreisen bzw. Sternen markierten Zahlen (Datensatznummern) sind Ausreißer bzw. Extremfälle.

In Abbildung 4-14. stellt sich der Zusammenhang zwischen dem relativen Anteil der Ki67 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (G) des Tumors anhand eines Boxplotdiagrammes dar.

Hier kann man ebenfalls ein einheitliches Bild erkennen. Für größere Gradingwerte ist auch der Ki67 Index erhöht.

Da nur ein Patient im Gradingstadium vier (anaplastisch) eingestuft wurde, blieb dieser bei der Auswertung unberücksichtigt.

4.3.4. Mittelwerte für den Ki67 und p53-Färbeindex aufgeteilt nach dem Tumorstadium (T)

Um einen statistischen Zusammenhang zwischen dem p53-Färbeindex bzw. Ki67-Färbeindex und dem Tumorstadium (T1-4) zu finden, wurden zuerst die Mittelwerte für den p53-Färbeindex bzw. Ki67-Färbeindex erstellt. Die Mittelwerte sind aufgeteilt nach dem Tumorstadium. (Tabelle 4-9., 4-10., 4-11. und 4-12.)

Für den **p53-Färbeindex** ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Für pT1 liegt der Mittelwert bei 12,3. Der Mittelwert für den T2 Tumor ist mit 4 am kleinsten. Danach steigen wieder die Werte für T3 auf 19,6 und für T4 auf 30,5.

Für den **Ki67-Färbeindex** zeigen die Mittelwerte, dass mit zunehmendem Tumor-Stadium auch der Index von Ki67 ansteigt. Für pT1 liegt der Mittelwert bei 2,7, für pT2 bei 4,7, für pT3 bei 5,2 und schließlich für pT4 bei 6,5.

pT = 1

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	10	,00	48,46	12,3890	16,05883
Ki67_index	10	,00	8,62	2,7630	3,47105
Gültige Werte (Listenweise)	10				

Tabelle 4-9.

pT = 2

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	25	,00	56,72	4,0200	11,89491
Ki67_index	25	,00	30,77	4,7184	8,02211
Gültige Werte (Listenweise)	25				

Tabelle 4-10.

pT = 3

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	45	,00	89,57	19,6838	26,71028
Ki67_index	45	,00	47,89	5,2109	9,67534
Gültige Werte (Listenweise)	45				

Tabelle 4-11.

pT = 4

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	8	,00	70,75	30,5975	33,12661
ki67_index	8	,00	21,43	6,5025	8,21263
Gültige Werte (Listenweise)	8				

Tabelle 4-12.

4.3.5. Zusammenhang zwischen dem p53 –Färbeindex und dem Tumorstadium (T)

In Abbildung 4-15. stellt sich der Zusammenhang zwischen dem relativen Anteil der p53 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Tumorstadium (T) anhand eines Boxplotdiagrammes dar. Die Gruppe der pT2-Tumoren zeigt den niedrigsten p53-Index.

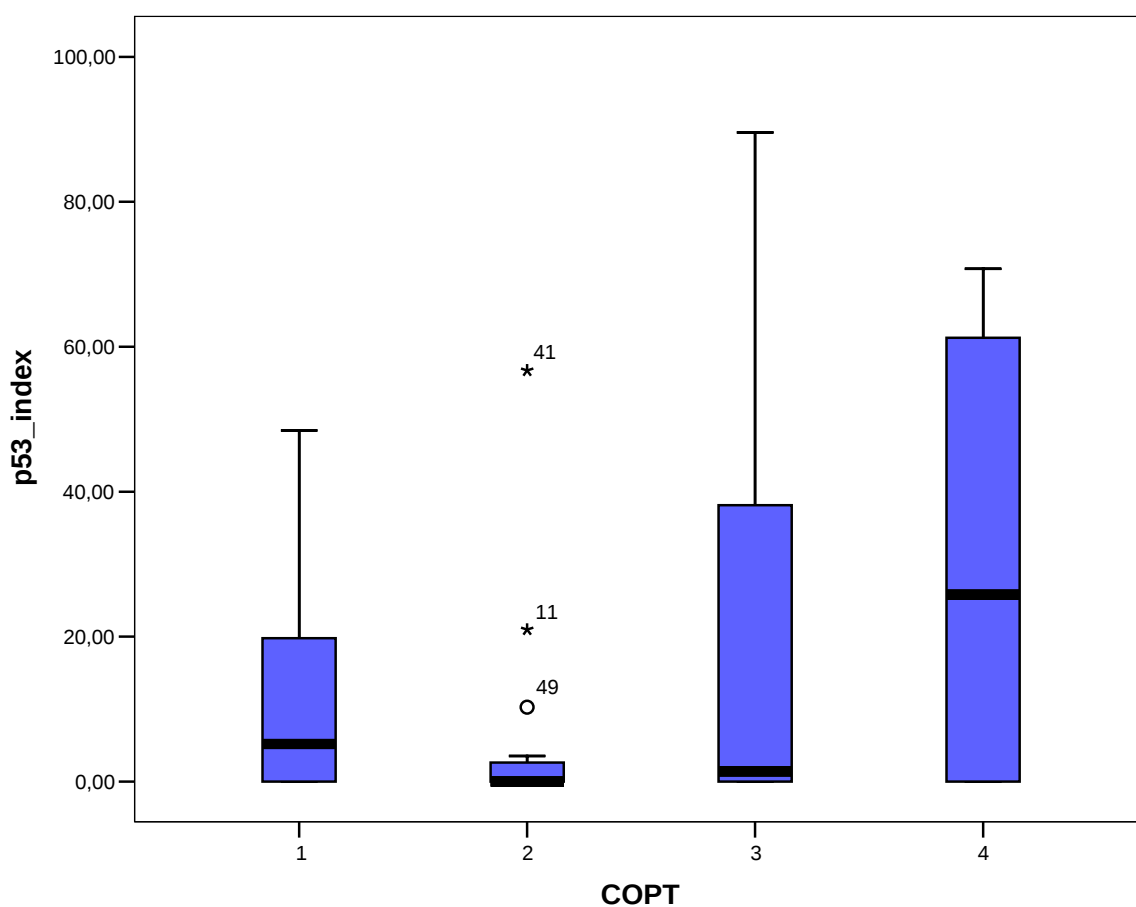


Abbildung 4-15. Relativer Anteil der p53-positiven Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Tumorstadium. Die mit Kreisen bzw. Sternen markierten Zahlen (Datensatznummern) sind Ausreißer bzw. Extremfälle.

4.3.6. Zusammenhang zwischen dem Ki67 –Färbeindex und dem Tumorstadium (T)

In Abbildung 4-16. stellt sich der Zusammenhang zwischen dem relativen Anteil der Ki67 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit vom Tumorstadium (T) anhand eines Boxplotdiagrammes dar. Eine leichte Erhöhung des Ki67-Index zeigt sich mit steigendem Tumorstaging.

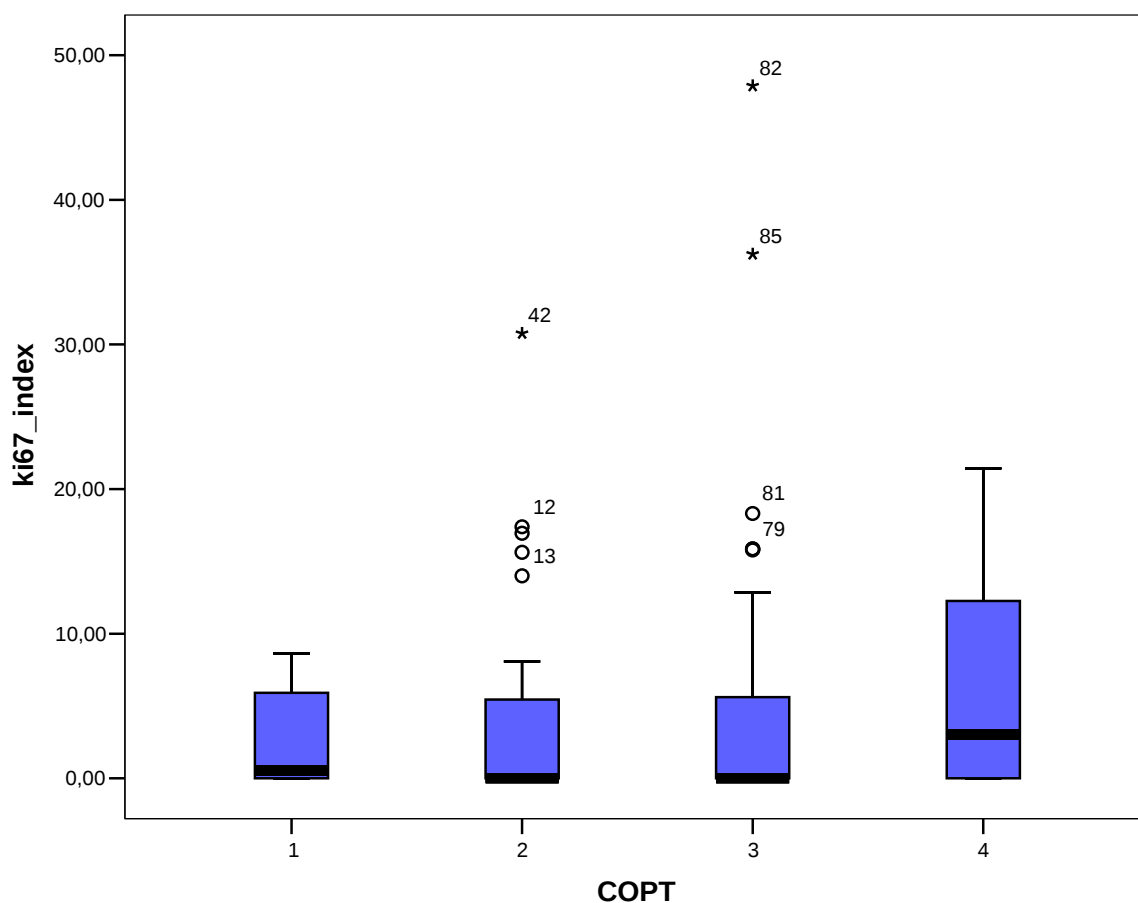


Abbildung 4-16. Relativer Anteil der Ki67-positiven Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Tumorstadium. Die mit Kreisen bzw. Sternen markierten Zahlen (Datensatznummern) sind Ausreißer bzw. Extremfälle.

4.3.7. Mittelwerte für den Ki67- und p53-Färbeindex aufgeteilt nach dem Lymphknotenstatus (N)

Um einen statistischen Zusammenhang zwischen dem P53-Färbeindex und dem Lymphknotenstatus zu finden, wurden zuerst die Mittelwerte für den p53-Färbeindex bzw. Ki67-Färbeindex erstellt, aufgeteilt nach dem Lymphknotenstatus der Patienten. (Tabelle 4-13., 4-14. und 4-15.)

Aufgeteilt nach der Kategorie N (Lymphknotenstatus), zeigen die Mittelwerte für den **p53-Index** ein uneinheitliches Bild. Der Mittelwert für N1 ist mit 24,5 am größten. Für N2 wurde ein Mittelwert von 15 errechnet und für N0 ein Mittelwert von 14. Allerdings ist die Zellbesetzung nur für die Kategorie N0 hinreichend.

Bei **Ki67** zeigt sich für die größte Kategorie N2 ein deutlich erhöhter Index von 14,6, während bei N0 und N1 die Mittelwerte recht ähnlich ausfielen (für N0 3,8 und für N1 3,7).

N = 0

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	71	,00	89,57	14,2103	23,57871
Ki67_index	71	,00	30,77	3,8538	6,12289
Gültige Werte (Listenweise)	71				

Tabelle 4-13.

N = 1

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	5	,00	69,58	24,5880	30,90193
Ki67_index	5	,00	15,87	3,7300	6,89240
Gültige Werte (Listenweise)	5				

Tabelle 4-14.

N = 2

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
p53_index	6	,00	70,75	15,0600	28,38765
Ki67_index	6	,00	47,89	14,6050	19,01640
Gültige Werte (Listenweise)	6				

Tabelle 4-15.

4.3.8. Zusammenhang zwischen dem Ki67-Färbeindex und dem Lymphknotenstatus (N)

In Abbildung 4-17. stellt sich der Zusammenhang zwischen dem relativen Anteil der Ki67 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstadium (N) anhand eines Boxplotdiagrammes dar. Für die Gruppe der N2-Tumoren zeigt sich der höchste Ki67-Index.

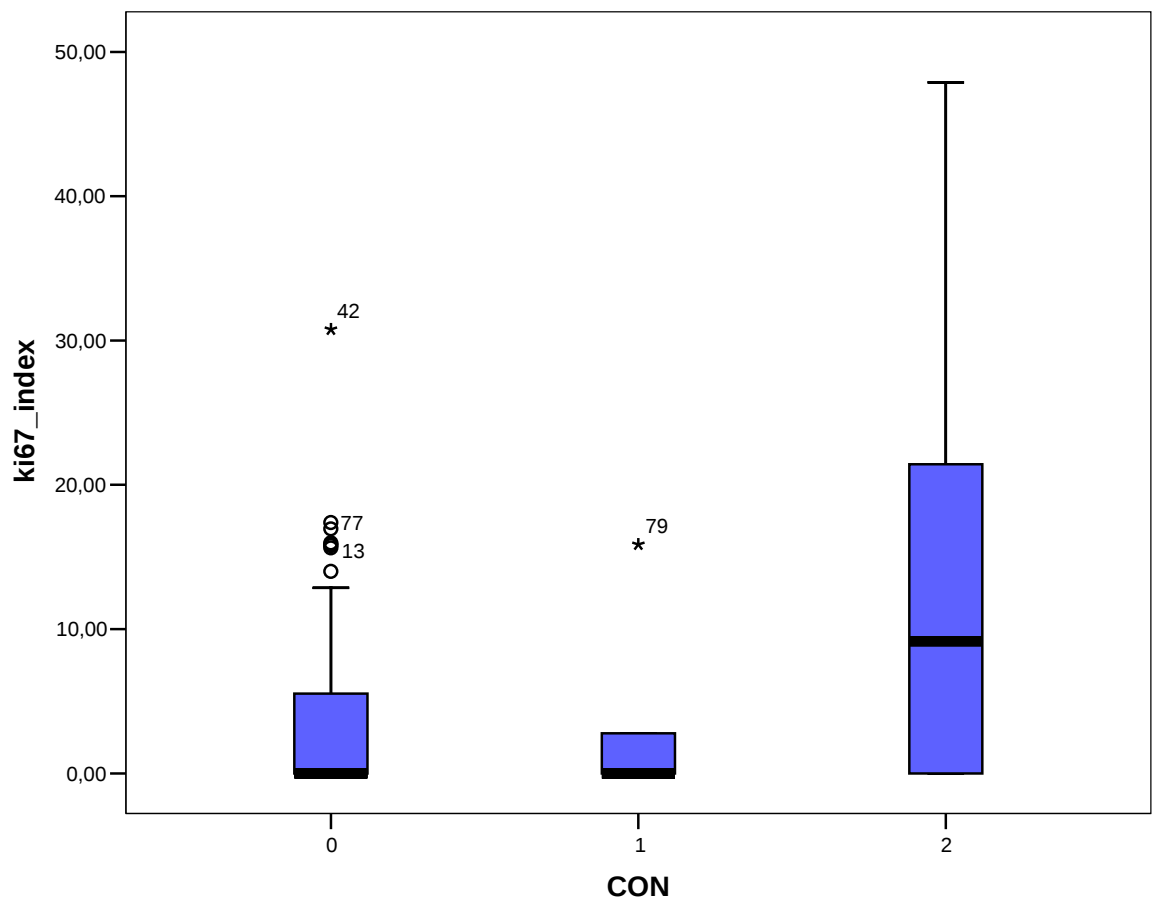


Abbildung 4-17. Relativer Anteil der Ki67-positiven Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstadium. Die mit Kreisen bzw. Sternen markierten Zahlen (Datensatznummern) sind Ausreißer bzw. Extremfälle.

4.3.9. Zusammenhang zwischen dem p53 –Färbeindex und dem Lymphknotenstatus (N)

In Abbildung 4-18. stellt sich der Zusammenhang zwischen dem relativen Anteil der p53 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstadium (N) anhand eines Boxplotdiagrammes dar. Hier zeigt sich eine uneinheitliche Verteilung. Den höchsten p53-Index zeigt die N1 Gruppe.

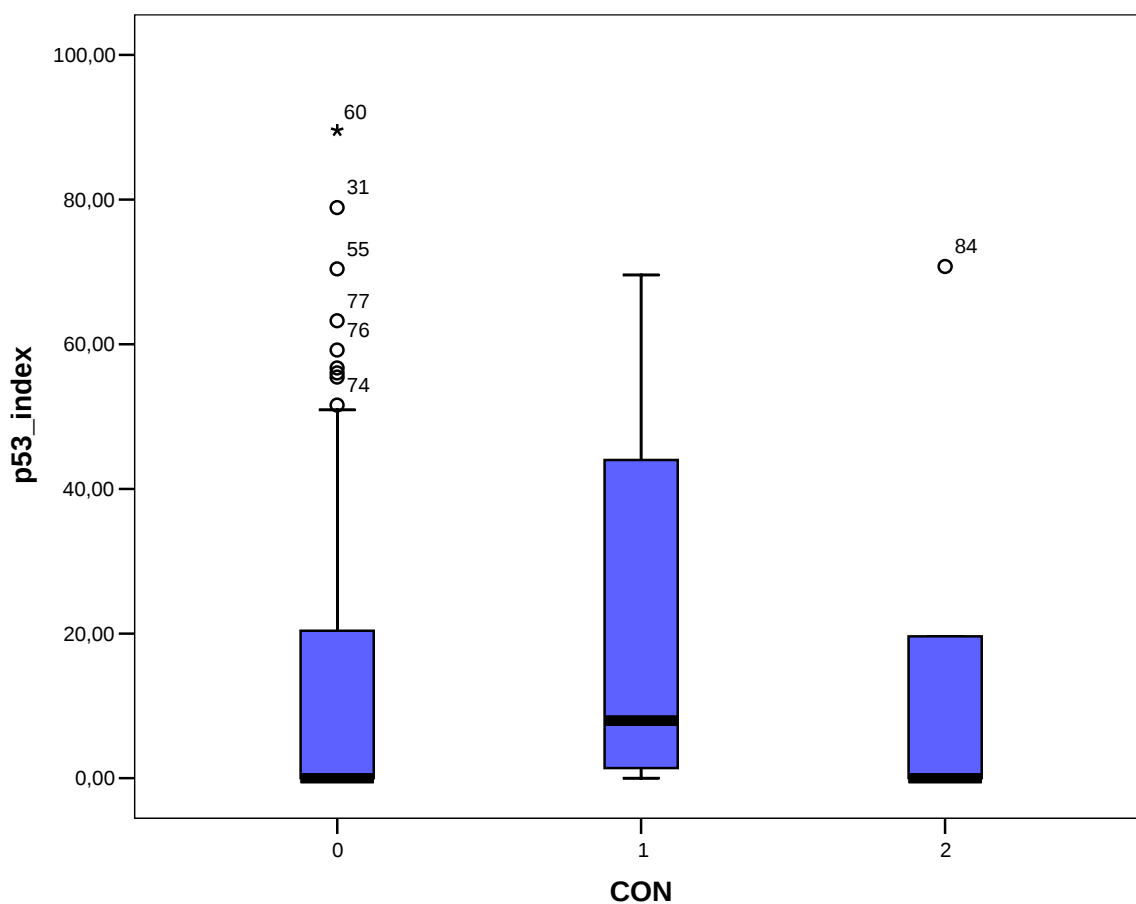


Abbildung 4-18. Relativer Anteil der p53-positiven Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstadium. Die mit Kreisen bzw. Sternen markierten Zahlen (Datensatznummern) sind Ausreißer bzw. Extremfälle.

4.3.10. Korrelationen nach Spearman für die Variablen T (Tumorstadium), N (Lymphknotenstatus) und G (Differenzierungsgrad des Tumors) in Zusammenhang mit dem p53- und Ki67-Index

Eine Korrelation benutzt man, um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob zwei statistische Größen ursächlich miteinander zusammenhängen.

Ein Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ist ein parameterfreies Maß für Korrelationen. Er misst, wie gut eine beliebige monotone Funktion den Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreiben kann, ohne irgendwelche Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Variablen zu machen. Hier wurde die Korrelationsmethode nach Spearman ausgesucht, da ich bei den Variablen immer eine ordinale Variable vorliegen habe. Die Korrelation nach Spearman untersucht Zusammenhänge unabhängiger Variablen bei ordinaler Skalierung. Als Ergebnis der Berechnung ergibt sich der Rangkorrelationskoeffizient r_s . Für den Koeffizienten gilt: $+1 > r_s > -1$. Je weiter sich die Zahlenwerte an $+1$ oder -1 annähern, desto größer ist der Zusammenhang bzw. die Abhängigkeit der Messreihen zueinander.

Bei den durchgeführten Korrelationen nach Spearman (Tabelle 4-16., 4-17. und 4-18.) ergeben sich keine Zusammenhänge zwischen pT, N und G und den p53 bzw. den Ki67-Index.

			pT	p53_index	Ki67_index
Spearman-Rho	pT	Korrelationskoeffizient	1,000	,178	,073
		Sig. (2-seitig)	.	,097	,499
		N	88	88	88
	p53_index	Korrelationskoeffizient	,178	1,000	,336
		Sig. (2-seitig)	,097	.	,001
		N	88	88	88
	Ki67_index	Korrelationskoeffizient	,073	,336	1,000
		Sig. (2-seitig)	,499	,001	.
		N	88	88	88

Tabelle 4-16.

			N	p53_index	Ki67_index
Spearman-Rho	N	Korrelationskoeffizient	1,000	,067	,089
		Sig. (2-seitig)	.	,548	,425
		N	82	82	82
	p53_index	Korrelationskoeffizient	,067	1,000	,336
		Sig. (2-seitig)	,548	.	,001
		N	82	88	88
	Ki67_index	Korrelationskoeffizient	,089	,336	1,000
		Sig. (2-seitig)	,425	,001	.
		N	82	88	88

Tabelle 4-17.

			G	p53_index	Ki67_index
Spearman-Rho	G	Korrelationskoeffizient	1,000	,171	,125
		Sig. (2-seitig)	.	,113	,250
		N	87	87	87
	p53_index	Korrelationskoeffizient	,171	1,000	,336
		Sig. (2-seitig)	,113	.	,001
		N	87	88	88
	Ki67_index	Korrelationskoeffizient	,125	,336	1,000
		Sig. (2-seitig)	,250	,001	.
		N	87	88	88

Tabelle 4-18.

4.4. Statistische Auswertungen der unterschiedlichen Intensität (0-3) von Ki67 und p53 in Zusammenhang mit dem Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Differenzierungsgrad des Tumors

Um einen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Intensitäten von Ki67 bzw. p53 und dem Tumorstadium bzw. Tumorgrading bzw. Lymphknotenstatus der Tumoren zu erfassen, wurden Kreuztabellen inklusive Signifikanztests (Chi-Quadrat-Test) und Korrelationen (ebenfalls nach Spearman) erstellt. Aus den Kreuztabellen wurden Balkendiagramme erstellt.

4.4.1. Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von p53 in Zusammenhang mit dem Tumorstadium (T), (Tabellen 4-19. und 4-20.)

Für den Chi-Quadrat-Test wird ein p von 0,024 errechnet. Hiermit liegt er unter 0,05 und gilt als signifikant. Für die Korrelation nach Spearman ergibt sich ein p von 0,116. Dieser ist nicht signifikant.

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	19,127	9	,024
Likelihood-Quotient	19,653	9	,020
Zusammenhang linear-mit-linear	2,826	1	,093
Anzahl der gültigen Fälle	88		

Tabelle 4-19.

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler	Näherungsweise T	Näherungsweise Signifikanz
Intervall- bzgl. Intervallmaß	Pearson-R	,180	,098	1,699	,093
Ordinal- bzgl. Ordinalmaß	Korrelation nach Spearman	,169	,104	1,590	,116
Anzahl der gültigen Fälle		88			

Tabelle 4-20.

4.4.2. Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von Ki67 im Zusammenhang mit dem Tumorstadium (T), (Tabellen 4-21. und 4-22.)

Hier ergibt sich keine Signifikanz. Für den Chi-Quadrat-Test ist $p=0,972$ und die Korrelation nach Spearman ergibt ein $p=0,840$.

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,787	9	,972
Likelihood-Quotient	3,641	9	,933
Zusammenhang linear-mit-linear	,008	1	,930
Anzahl der gültigen Fälle	88		

Tabelle 4-21

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler	Näherungsweise T	Näherungsweise Signifikanz
Intervall- bzgl. Intervallmaß	Pearson-R	,009	,109	,087	,931
Ordinal- bzgl. Ordinalmaß	Korrelation nach Spearman	,022	,109	,202	,840
Anzahl der gültigen Fälle		88			

Tabelle 4-22.

4.4.3. Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von p53 im Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N), (Tabelle 4-23. und 4-24.)

Hier zeigt sich keine Signifikanz. Für den Chi-Quadrat-Test ist $p=0,363$ und die Korrelation nach Spearman ergibt ein $p=0,6$.

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	6,563	6	,363
Likelihood-Quotient	6,084	6	,414
Zusammenhang linear-mit-linear	,048	1	,826
Anzahl der gültigen Fälle	82		

Tabelle 4-23.

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler	Näherungsweise T	Näherungsweise Signifikanz
Intervall- bzgl. Intervallmaß	Pearson-R	,024	,111	,219	,828
Ordinal- bzgl. Ordinalmaß	Korrelation nach Spearman	,059	,110	,526	,600
Anzahl der gültigen Fälle		82			

Tabelle 4-24.

4.4.4. Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von Ki67 in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N), (Tabelle 4-25. und 4-26.)

Hier ergibt sich keine Signifikanz. Für den Chi-Quadrat-Test ist $p=0,906$ und die Korrelation nach Spearman ergibt ein $p=0,966$.

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,147	6	,906
Likelihood-Quotient	3,113	6	,795
Zusammenhang linear-mit-linear	,067	1	,796
Anzahl der gültigen Fälle	82		

Tabelle 4-25.

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler	Näherungsweise T	Näherungsweise Signifikanz
Intervall- bzgl. Intervallmaß	Pearson-R	,029	,117	,257	,798
Ordinal- bzgl. Ordinalmaß	Korrelation nach Spearman	,005	,111	,043	,966
Anzahl der gültigen Fälle		82			

Tabelle 4-26.

4.4.5. Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von p53 in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G), (Tabelle 4-27. und 4-28.)

Die Tests zeigen keine Signifikanz. Für den Chi-Quadrat-Test ist $p=0,090$ und die Korrelation nach Spearman ergibt ein $p=0,244$.

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	10,955	6	,090
Likelihood-Quotient	11,451	6	,075
Zusammenhang linear-mit-linear	1,305	1	,253
Anzahl der gültigen Fälle	87		

Tabelle 4-27.

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler	Näherungsweise T	Näherungsweise Signifikanz
Intervall- bzgl. Intervallmaß	Pearson-R	,123	,107	1,144	,256
Ordinal- bzgl. Ordinalmaß	Korrelation nach Spearman	,126	,106	1,173	,244
Anzahl der gültigen Fälle		87			

Tabelle 4-28.

4.4.6. Signifikanztest und Korrelationen für die Intensität von Ki67 in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G), (Tabelle 4-29. und 4-30.)

Hier ergibt sich keine Signifikanz. Für den Chi-Quadrat-Test ist $p=0,988$ und die Korrelation nach Spearman ergibt ein $p=0,733$.

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,947	6	,988
Likelihood-Quotient	1,520	6	,958
Zusammenhang linear-mit-linear	,131	1	,717
Anzahl der gültigen Fälle	87		

Tabelle 4-29.

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler	Näherungsweise T	Näherungsweise Signifikanz
Intervall- bzgl. Intervallmaß	Pearson-R	,039	,104	,361	,719
Ordinal- bzgl. Ordinalmaß	Korrelation nach Spearman	,037	,107	,342	,733
Anzahl der gültigen Fälle		87			

Tabelle 4-30.

4.5. Kreuztabellen und Balkendiagramme

Die Balkendiagramme entsprechen den jeweiligen Kreuztabellen. Für jede Variable wurden zwei Balkendiagramme erstellt. Eine Graphik zeigt die absoluten Häufigkeiten und die andere zeigt die relativen (%) Häufigkeiten der jeweiligen Gruppe.

Insgesamt zeigt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Intensität der beiden Marker und dem Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Differenzierungsgrad des Tumors.

4.5.1. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT). Absolute Häufigkeiten. (Tabelle 4-31. und Abbildung 4-19.)

pT_p53_n	1	2	3	4
0	4	17	22	4
1	3	2	2	0
2	3	3	11	0
3	0	3	10	4

Tabelle 4-31.

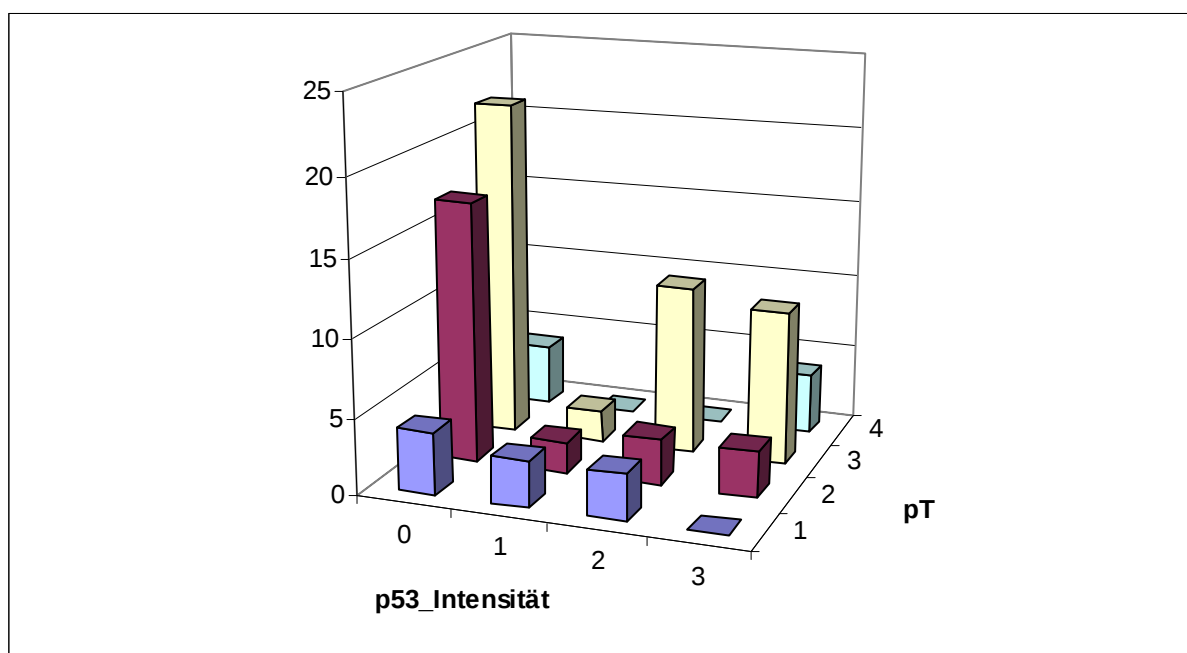


Abbildung 4-19.

4.5.2. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT). Relative Häufigkeiten. (Tabelle 4-32., Abbildung 4-20.)

pT_p53_ %	1	2	3	4
0	40,00%	68,00%	48,90%	50,00%
1	30,00%	8,00%	4,40%	0,00%
2	30,00%	12,00%	24,40%	0,00%
3	0,00%	12,00%	22,20%	50,00%

Tabelle 4-32.

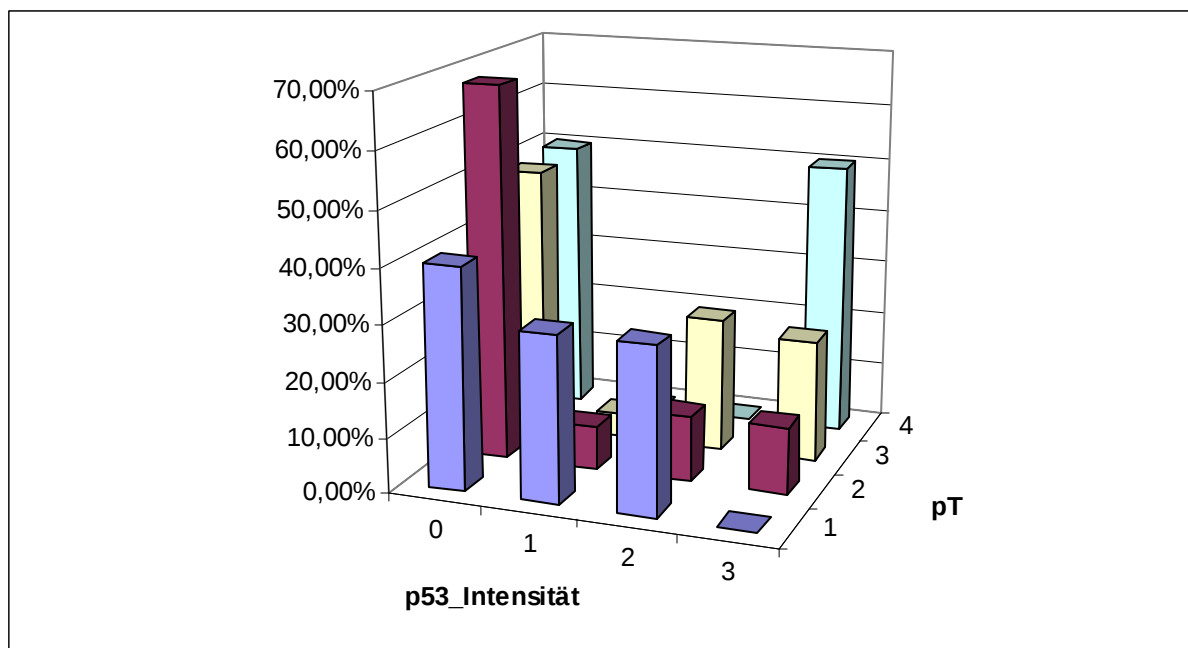


Abbildung 4-20.

4.5.3. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT). Absolute Häufigkeiten. (Tabelle 4-33., Abbildung 4-21.)

pT_Ki67_n	1	2	3	4
0	5	14	24	3
1	0	2	5	1
2	4	6	12	3
3	1	3	4	1

Tabelle 4-33.

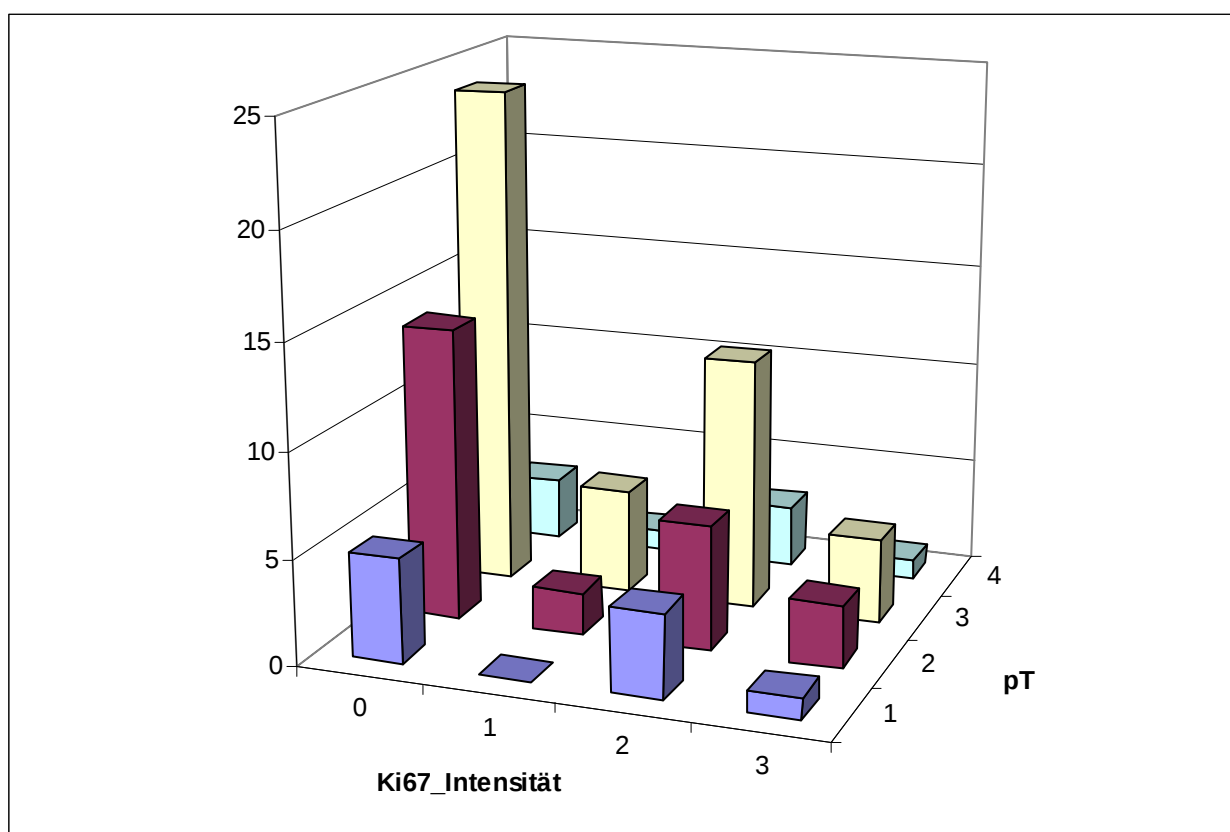


Abbildung 4-21.

4.5.4. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Tumorstaging (pT). Relative Häufigkeiten. (Tabelle 4-34., Abbildung 4-22.)

pT_Ki67_ %	1	2	3	4
0	50,00%	56,00%	53,30%	37,50%
1	0,00%	8,00%	11,10%	12,50%
2	40,00%	24,00%	26,70%	37,50%
3	10,00%	12,00%	8,90%	12,50%

Tabelle 4-34.

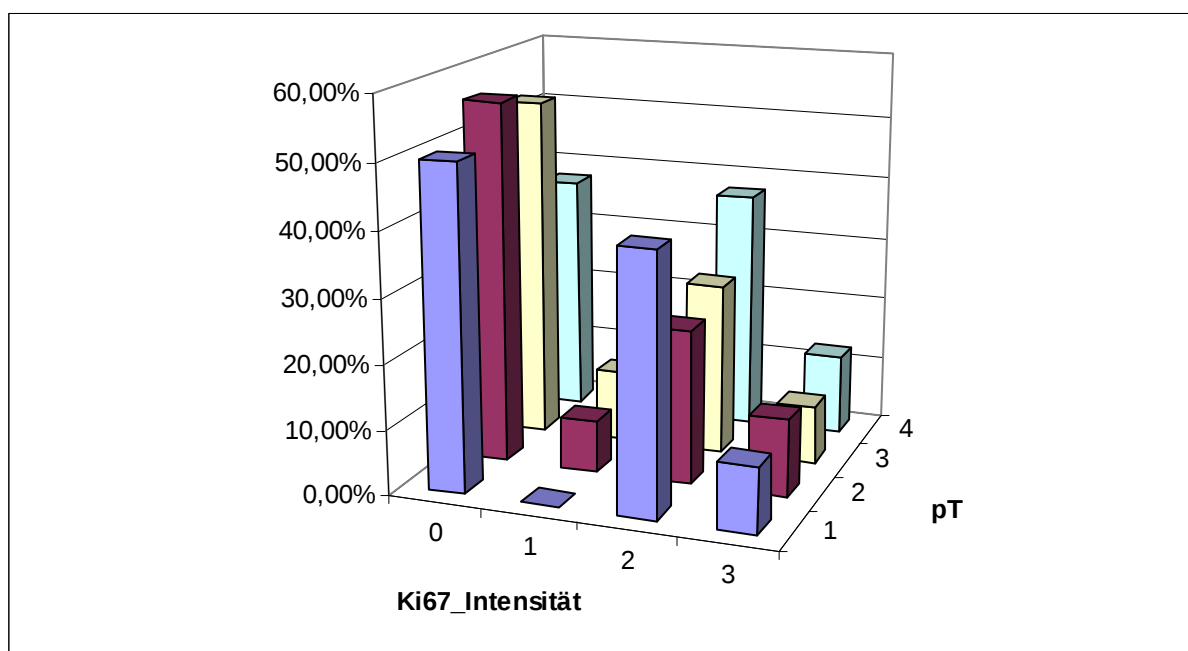


Abbildung 4-22.

4.5.5. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N). Absolute Häufigkeiten. (Tabelle 4-35., Abbildung 4-23.)

N_p53_n	0	1	2
0	40	1	4
1	5	0	0
2	12	3	1
3	14	1	1

Tabelle 4-35.

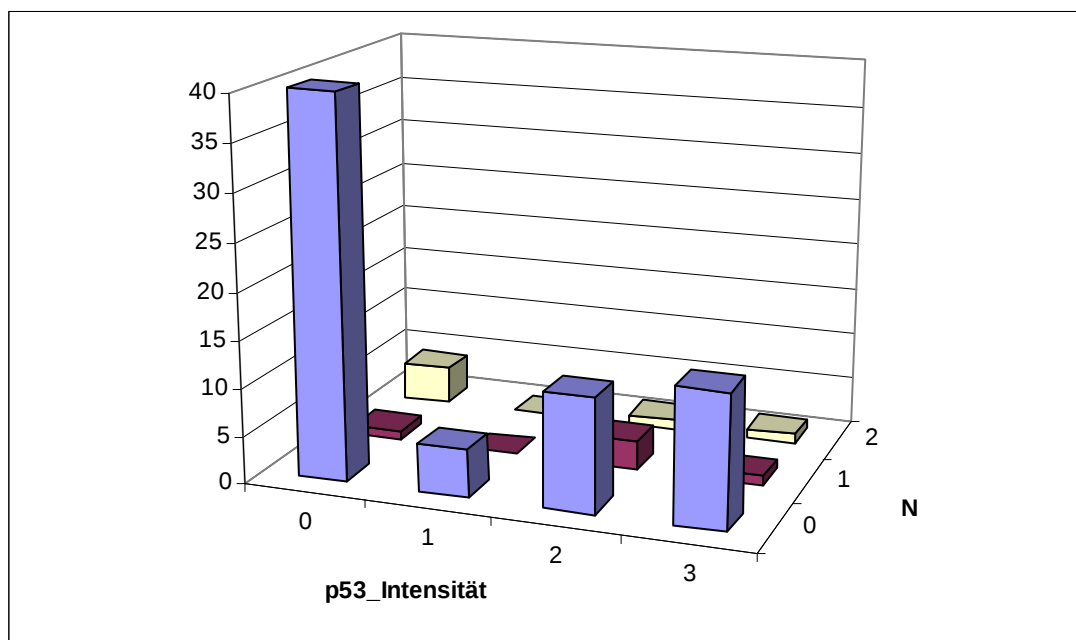


Abbildung 4-23.

4.5.6. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N). Relative Häufigkeiten. (Tabelle 4-36., Abbildung 4-24.)

N_p53_ %	0	1	2
0	56,30%	20,00%	66,70%
1	7,00%	0,00%	0,00%
2	16,90%	60,00%	16,70%
3	19,70%	20,00%	16,70%

Tabelle 4-36.

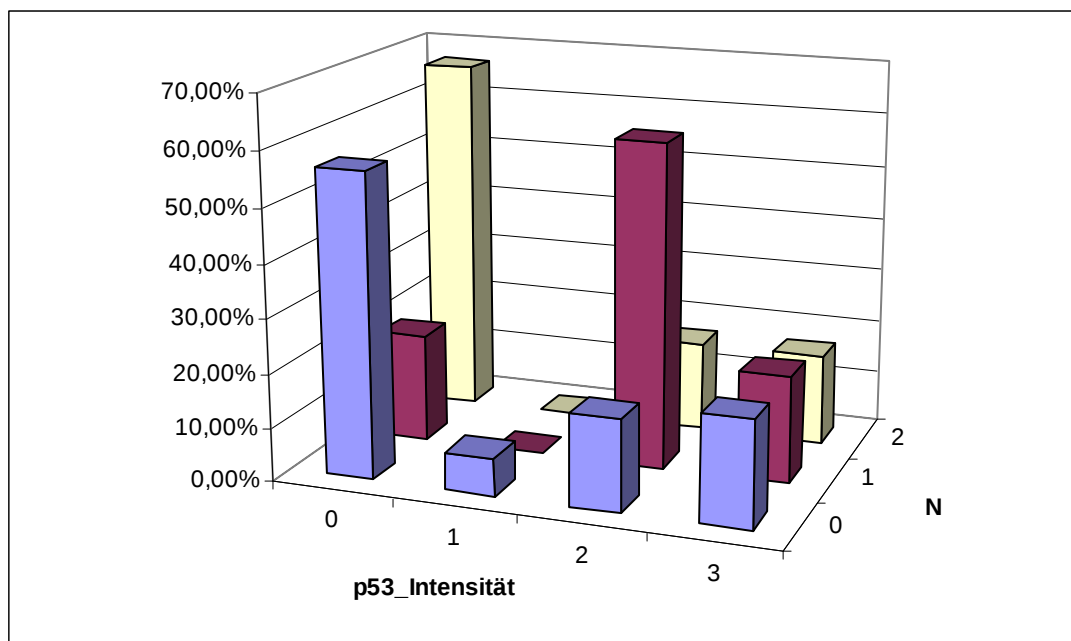


Abbildung 4-24.

4.5.7. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N). Absolute Häufigkeiten. (Tabelle 4-37., Abbildung 4-25.)

N_Ki67_n	0	1	2
0	39	3	3
1	7	1	0
2	17	1	2
3	8	0	1

Tabelle 4-37.

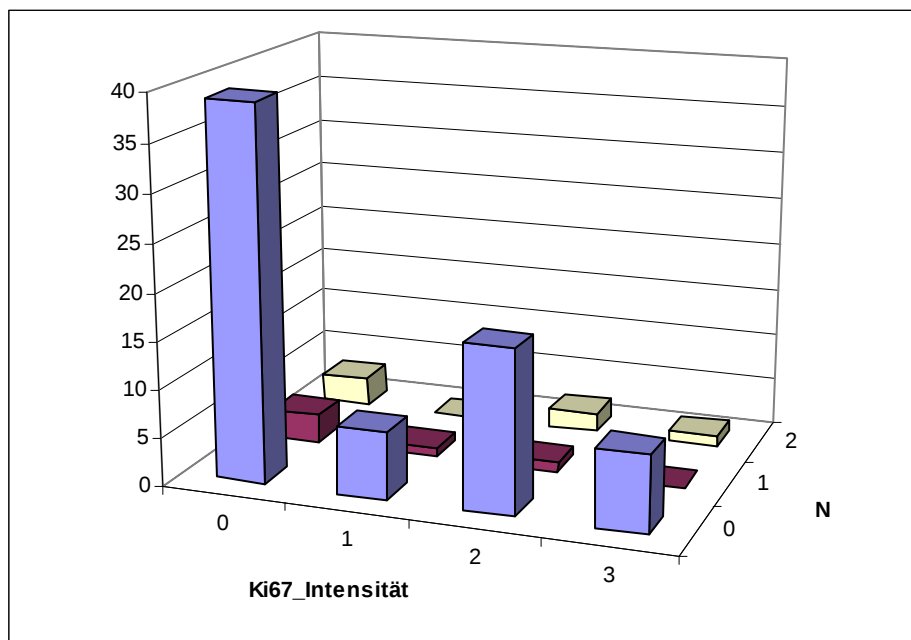


Abbildung 4-25.

4.5.8. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N). Relative Häufigkeiten. (Tabelle 4-38., Abbildung 4-26.)

N Ki67 %	0	1	2
0	54,90%	60,00%	50,00%
1	9,90%	20,00%	0,00%
2	23,90%	20,00%	33,30%
3	11,30%	0,00%	16,70%

Tabelle 4-38.

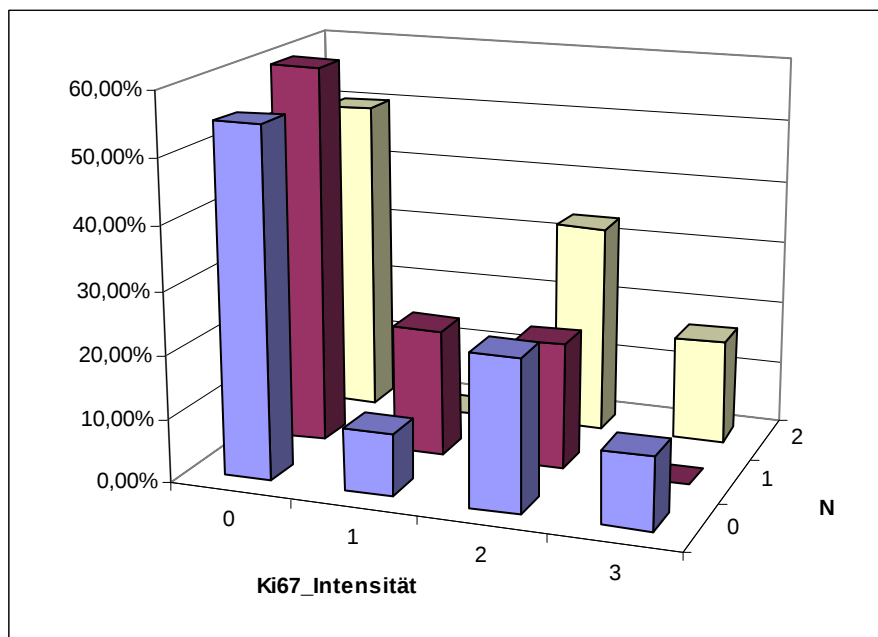


Abbildung 4-26.

4.5.9. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G). Absolute Häufigkeiten. (Tabelle 4-39., Abbildung 4-27.)

G_p53_n	1	2	3
0	1	21	25
1	1	3	3
2	0	9	7
3	1	2	14

Tabelle 4-39.

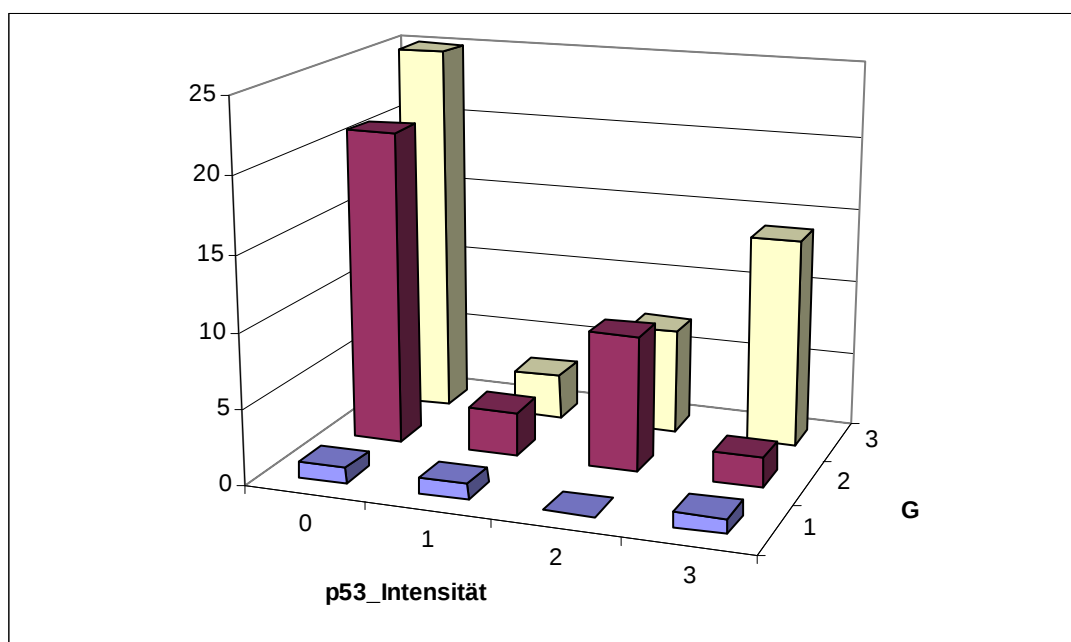


Abbildung 4-27.

4.5.10. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der p53-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G). Relative Häufigkeiten. (Tabelle 4-40., Abbildung 4-28.)

G_p53 %	1	2	3
0	33,30%	60,00%	51,00%
1	33,30%	8,60%	6,10%
2	0,00%	25,70%	14,30%
3	33,30%	5,70%	28,60%

Tabelle 4-40.

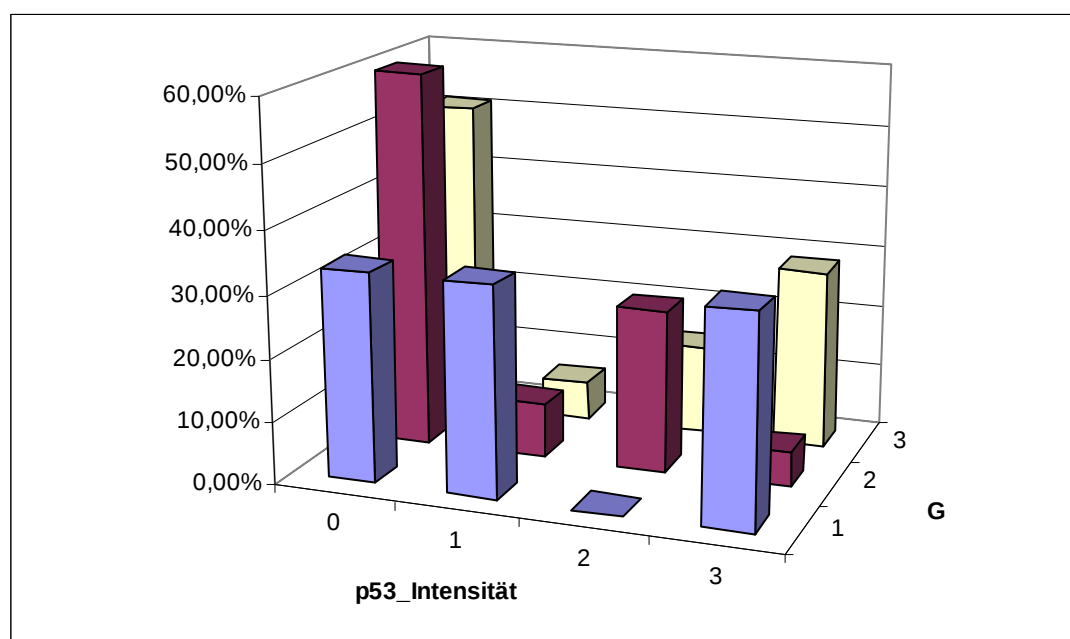


Abbildung 4-28.

4.5.11. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G). Absolute Häufigkeiten. (Tabelle 4-41., Abbildung 4-29.)

G_Ki67_n	1	2	3
0	2	19	25
1	0	3	5
2	1	9	14
3	0	4	5

Tabelle 4-41.

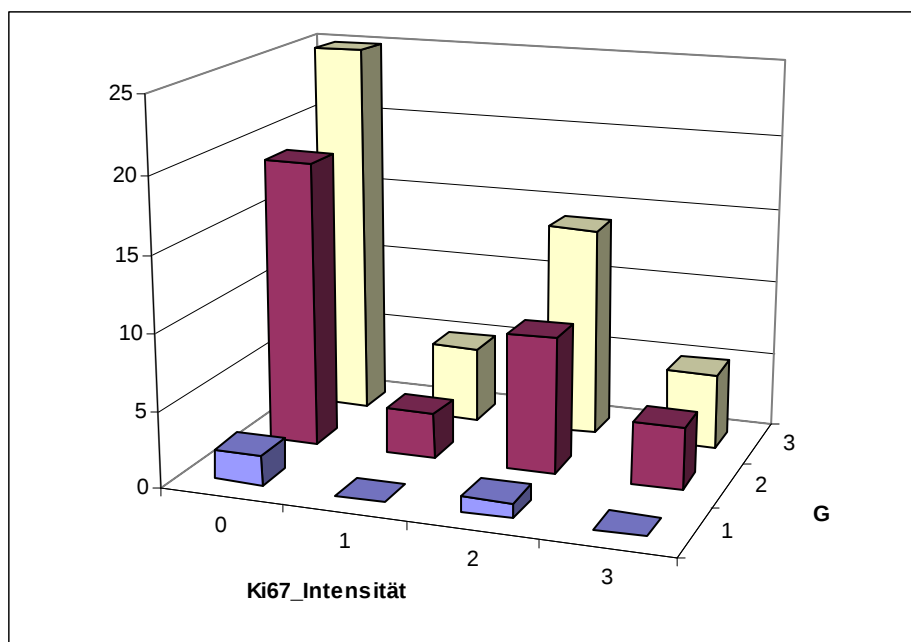


Abbildung 4-29.

4.5.12. Kreuztabelle und Balkendiagramm für die Intensität der Ki67-markierten Zellkerne in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (G). Relative Häufigkeiten. (Tabelle 4-42., Abbildung 4-30.)

G_Ki67 %	1	2	3
0	66,70%	54,30%	51,00%
1	0,00%	8,60%	10,20%
2	33,30%	25,70%	28,60%
3	0,00%	11,40%	10,20%

Tabelle 4-42.

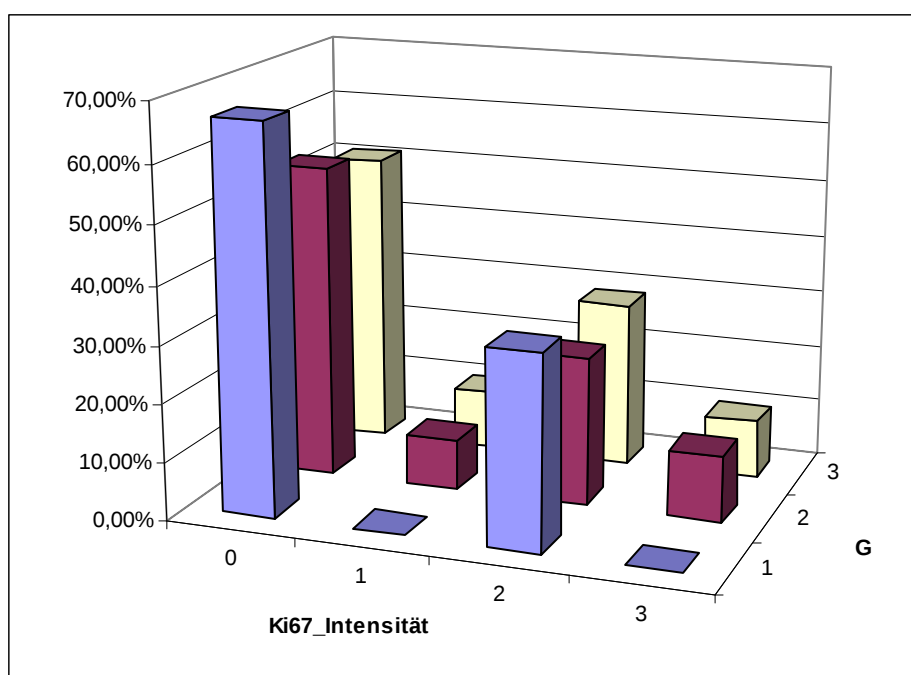


Abbildung 4-30.

5. Diskussion

5.1. Beurteilung der Methodik und möglicher Fehlerquellen

Von 103 Gewebeproben haben für den Antikörper Ki67 nur 48 Proben (47%) eine spezifische Färbung gezeigt.

Für den Antikörper p53 haben 58 Proben (56%) eine spezifische Färbung gezeigt. Sauter G. beschrieb 2004 ebenfalls bei invasiven Blasentumoren eine Mutation des TP53 von 40% - 60%.

Ungefähr die Hälfte der Proben haben sowohl für Ki67 als auch für p53 keinerlei spezifische Färbung gezeigt. Es ist möglich, dass unter diesen 47% für Ki67 und 56% für p53 sich auch falsche negative Ergebnisse verbergen.

Anbei sind mögliche Erklärungsversuche sowohl für falsche positive als auch für falsche negative Ergebnisse.

Bei der Requirierung des Tumormaterials und der Konservierung des Gewebes in Paraffin sollten die gleichen Abläufe und Zeiten eingehalten werden. In der Klinikroutine wird das Gewebe vom Patienten entnommen und in Formalin in das histopathologische Laboratorium gebracht. Hier wird das Gewebe weiterverarbeitet und in Paraffin eingebettet. Auf diesem Weg entstehen unterschiedliche Zeiten der Fixation, die variieren können von wenigen Stunden, Tagen bis Wochen. Der Erhalt der Antigene im paraffineingebetteten Gewebe kann dadurch unterschiedlich sein und damit wird auch die Intensität der immunhistochemischen Färbung unterschiedlich sein. Um diesen Effekt zu reduzieren, ist eine optimale Antigendemaskierung notwendig (45).

Wichtig ist ebenfalls die richtige Auswahl der Antikörper. Man unterscheidet poly- und monoklonale Antikörper. Der Unterschied liegt in der Anzahl der Antigenendeterminanten, gegen den der Antikörper gerichtet ist. Monoklonale Antikörper erkennen nur ein Epitop eines Antigens und sind deshalb sehr spezifisch. Polyklonale Antikörper erkennen mehrere antigene Determinanten. Der polyklonale Antikörper ist deshalb für Veränderungen an einem Epitop nicht so anfällig, kann aber aufgrund der Verschiedenheit der einzelnen Epitope, die erkannt werden müssen, zu unerwünschten Kreuzreaktionen mit anderen sehr

ähnlichen Antigenstrukturen führen. Dies entspricht falschen positiven Ergebnissen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Antikörperarten ist die Reproduzierbarkeit der immunhistochemischen Ergebnisse mit ihnen. Durch die Herstellungsweise der polyklonalen Antikörper (Immunisierung und „boostern“ von Tieren) ist die Reproduzierbarkeit begrenzt und es können erhebliche, nicht zu unterschätzende Konzentrationsunterschiede bei verschiedenen Chargen auftreten. Monoklonale Antikörper haben aufgrund der Herstellungsmethode (Immunisierung eines Tieres mit darauffolgender Herstellung von Hybridomzellen, die den monoklonalen Antikörper produzieren) keine chargenabhängigen Qualitätsschwankungen.

In der Avidin-Biotin-Komplex-Methode wird die Peroxidase aus dem HRP-Komplex, die an den biotinylierten Sekundärantikörper gebunden ist, mit Hilfe des Substrates DAB (Diaminobenzidin) detektiert. Hierbei tritt eine charakteristische Färbung auf. Das chromogen DAB wird aber nicht nur vom Enzym des Detektionssystems umgesetzt, sondern auch vom endogenen Enzym des Gewebes. Diese endogene Peroxidase muss in der Versuchsreihe erfolgreich gehemmt werden, um falsche positive Ergebnisse zu vermeiden.

Ebenfalls kann sich die Peroxidase aus dem HRP-Komplex an das Vitamin Biotin binden und somit zu falschen positiven Ergebnissen führen.

Um die immunhistochemischen Untersuchungen der beiden Kernmarkern Ki67 und p53 zu diagnostischen Zwecken zu nutzen und gegebenenfalls davon abhängig therapeutische Maßnahmen zu ergreifen, muss die Methode reproduzierbar sein und eine Standardisierung erfahren.

5.2. Diskussion der Ergebnisse für p53

Für den Antikörper p53 haben 58 Proben (56%) eine spezifische Färbung gezeigt. Die restlichen 44% hatten eine Markierung 0, das heißt, man kann keine spezifische Färbung auf dem Präparat erkennen. Diese Gruppe ohne Markierung unterteilt sich wiederum in zwei Gruppen. Keine Markierung heißt, der Tumor exprimiert ein wild type p53 Protein, welches durch die normale

Regulation des p53 schnell abgebaut wird, so dass es immunhistochemisch nicht möglich ist, dieses Protein zu markieren. Die zweite Möglichkeit, eine Markierung 0 zu erzielen, heißt, der Tumor besitzt eine TP53 Mutation, die bewirkt, dass die Zelle gar kein p53 Protein exprimiert.

So lassen sich auch die Markierung 0 bei den pT4 Tumoren, N2 und G3 Tumoren erklären. Diese entsprechen sehr wahrscheinlich der TP53 Mutation ohne jegliche Expression eines p53 Proteins oder diese Tumore haben eine andere Entstehungshistorie, welche die Mutation des TP53 nicht mit einschließen.

Durch die große Zahl der Datensätze mit 0 sind die Boxplotdiagramme sehr niedrig. Dennoch kann man die verschiedenen Mittelwertunterschiede deutlich sehen.

Wenn man den p53 Index in Zusammenhang mit dem Tumorstadium betrachtet, kann man eine Steigerung des p53 Indexes mit der Erhöhung des Tumorstadiums sehen. Ausnahme macht die Gruppe der pT2 Tumoren mit dem niedrigsten p53 Index. Es zeigt sich hier keine Signifikanz bei einem $p=0,97$.

Der Zusammenhang zwischen dem p53 und dem Lymphknotenstatus zeigt bei einem $p=0,548$ ebenfalls keine Signifikanz. Die Gruppe der N1 Tumoren zeigt die höchsten p53-Index Werte.

Wenn man den p53-Index in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors sieht, kann man eine Steigerung des p53-Indices mit der Steigerung des Gradings sehen. Es zeigt sich hier bei einem $p=0,113$ keine Signifikanz.

Betrachtet man die Intensität der mit p53 markierten Kerne in Zusammenhang mit dem Tumorstadium, zeigt sich eine gute Korrelation mit einem $p=0,024$ (signifikant). Die Intensität mit der Markierung drei (die höchste) ist am häufigsten (50%) in den pT4 Tumoren. Während die Intensität eins, eine schwache Markierung, am häufigsten (30%) in den pT1 Tumoren ist, folgen die Gruppe der pT2 Tumoren mit 8%, die pT3 Tumoren mit 4,4% und die Gruppe von pT4 Tumoren mit 0%. Mit einer Zweimarkierung (gut) waren am häufigsten die pT1 Tumore mit 30%, gefolgt von den pT3 Tumoren mit 24,4% und zum Schluss die pT2 Tumore mit 12%.

Wenn man die Intensität der p53 markierten Kerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus betrachtet, zeigt sich keine Signifikanz der Korrelation $p=0,363$.

Keine Signifikanz zeigt ebenfalls die Korrelation der Intensität der p53 markierten Kerne mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren. Hierfür ergibt sich ein $p=0,090$.

Die erzielten Ergebnisse stimmen mit den neuen Erkenntnissen über die Verschiedenartigkeit der TP53 Mutationen und deren unterschiedlichen Tumorphentyp überein. Nur durch die immunhistochemische Markierung des p53 Proteins kann man keine Aussage über die Prognose des Tumors machen. Um p53 als Biomarker für die Diagnostik und Prognostik oder als Ziel für weiterführende Therapien zu nutzen, ist eine akkurate Beurteilung der TP53 Mutation in dem Tumorgewebe nötig.

Der prognostische Wert von p53 wurde in verschiedenen Tumoren erforscht. Ein gutes Beispiel ist das Mammakarzinom. Sorlie zeigte 2003 fünf verschiedene Mutationstypen von TP53 im Mammakarzinom (49). Die unterschiedlichen Mutationstypen wurden mit unterschiedlichen Prognosen assoziiert.

Lipponen konnte 1993 in seiner Analyse von insgesamt 212 Harnblasenkarzinomen die nukleäre Überexpression von p53 mit dem Differenzierungsgrad des Tumors assoziieren ($p=0,014$). Die Expression von p53 hatte aber in einer multivariablen Analyse, laut Lipponen, für das klinische Stadium der Tumoren und den mitotischen Index keinen prognostischen Wert (23).

Dalbani zeigte 1995 in seiner immunhistochemischen Untersuchung von 60 Harnblasenkarzinomen mit dem p53 Marker, dass die Expression des p53-Proteins sehr wohl mit dem Differenzierungsgrad ($p=0,021$), dem Tumorstadium ($p=0,008$) und der Präsenz von Lymphknotenmetastasen ($p=0,007$) korreliert (8).

Zum selben Ergebnis wie Dalbani kam auch Ioachim 2000. Er untersuchte 88 Blasenkarzinome immunhistochemisch mit dem Marker p53 und zeigte, dass die Expression von p53 stark mit dem Tumorgrading ($p=0,008$) und dem Tumorstaging ($p=0,0038$) korreliert (18).

5.2.1. p53 als Therapieziel

Verschiedene kleine Moleküle und Peptide, die p53 als Ziel haben, wurden in den letzten Jahren entdeckt. Dazu gehören Moleküle, welche den p53 Mutanten reaktivieren in einer Form mit ähnlichen Eigenschaften wie wild type p53. Dazu gehören Moleküle, die das GOF des p53 Mutanten blockieren und Moleküle, die den Abbau von wild type p53 hemmen, indem sie die Bindung von MDM2 und p53 verhindern, oder die Aktivität der MDM2-E3 ubiquitin Ligase hemmen. Beispiele für solche Moleküle sind PRIMA 1, RITA und Phikan 059.

Ein anderer Forschungszweig beschäftigt sich mit der Immun- oder Gentherapie. Anormales p53 ist oft in Tumoren überexprimiert. Das kann eine Möglichkeit für T Zellen beinhalten, zwischen malignen und normalen Zellen zu unterscheiden. Theobald nutzt dieses Konzept und versucht, den Transfer von p53 spezifischen T-Zell Rezeptor Genen in humane T Zellen zu ermöglichen (53). Verschiedene Peptide, abstammend von p53, werden durch den Histokompatibilitätskomplex den T Zellen zur Wiedererkennung präsentiert. Diese könnten als ein universales tumorassoziiertes Antigen für eine Tumorummuntherapie dienen.

Eine andere Gentherapie wird in der Klinik getestet. Diese basiert auf der Expression des wild-type p53 Protein, welche mit Hilfe eines Vektors als TP53 in der Zelle eingeschleust wird. Advexin ist ein Adenovirus, welcher die Fähigkeit der Replikation verloren hat und als Vektor für normales TP53 Tumor-Supressor-Gen dient. Bei einem Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) hat man lokal intratumoral Advexin injiziert. Es zeigte sich eine komplette und dauerhafte Remission der injizierten Tumorstelle (44).

Der Verlust von p53 verleiht der Tumorzelle Resistenz gegenüber antikanzerigenen Agenten und deren wachstumshemmenden Eigenschaften, die durch DNA Schädigungen ihre Wirkung entfalten.

Generell zeigt sich, dass Tumore mit einer Expression von wild-type p53 besser auf konventionelle Chemotherapeutika ansprechen als solche mit Deletion oder Mutation von p53. Da die Remissionsrate von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium, die eine Polychemotherapie hinter sich haben, nicht zufriedenstellend ist, und die Überlebenszeit von Patienten mit metastasierten

Urothelkarzinom auch nach Polychemotherapie nur 14 Monate beträgt, könnte man durch Ersatz des p53 Gen die Wirkung der Chemotherapie voll ausschöpfen.

Die Expression des p53 Proteins immunhistochemisch darzustellen, reicht nicht aus, um eine Aussage über die Prognose der invasiven Urothelkarzinome zu machen. Es wird zusätzlich eine TP53 Gen-Sequenz-Analyse notwendig sein, auch im Hinblick auf eine mögliche zukünftige Gen-Therapie. Voraussetzung dafür sind ausreichende Kenntnisse über Wirkung der unterschiedlichen Mutationen von TP53 auf die Zelle.

5.3. Diskussion der Ergebnisse für Ki67

Ki67 färbt die Zellen im Gewebe an, die sich vermehren, die so genannte Wachstumsfraktion.

Auch für Ki67 waren 48 Proben (47%) dabei, welche keine spezifische Markierung (Markierung 0) aufwiesen. Bei diesen Proben war entweder die Antigendemaskierung nicht ausreichend, oder die Zellen dieser Tumoren befinden sich in der Ruhephase, in der G0 Phase. Durch die große Zahl der Datensätze mit 0 sind die Mediane der Boxplotdiagramme sehr niedrig. Dennoch kann man die verschiedenen Mittelwertunterschiede deutlich sehen.

Wenn man den Ki67 Index in Zusammenhang mit dem Tumorstadium betrachtet, kann man eine Steigerung innerhalb des Tumorstadiums sehen. Dabei zeigt sich keine Signifikanz bei einem $p=0,499$.

Der Zusammenhang zwischen dem Ki67 und dem Lymphknotenstatus zeigt bei einem $p= 0,425$ keine Signifikanz. Man kann eine deutliche Steigerung des Ki67-Index von N1 auf mehr als das Doppelte in der N2 Gruppe feststellen.

Wenn man den Ki67-Index in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors sieht, kann man eine Steigerung innerhalb des Gratings erkennen. Es zeigt sich auch hier bei einem $p=0,250$ keine Signifikanz.

Betrachtet man die Intensität der mit Ki67 markierten Kerne in Zusammenhang mit dem Tumorstadium, so zeigt sich keine Korrelation ($p=0,84$).

Wenn man die Intensität der Ki67 markierten Kerne in Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus betrachtet, zeigt sich keine Signifikanz der Korrelation $p=0,966$.

In den Balkendiagrammen, die die oben genannten Zusammenhänge darstellen, kann man keinen Trend erkennen.

Keine Signifikanz zeigt ebenfalls die Korrelation der Intensität der Ki67 markierten Kerne mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren. Hierfür ergibt sich ein $p=0,733$. In dem Balkendiagramm mit absoluten Zahlen kann man eine Steigerung der Intensität der mit Ki67 positiv markierten Kerne mit erhöhtem Grading erkennen.

In der Literatur waren neben Untersuchungen an Urothelkarzinomen auch andere Tumorlokalisationen zu finden. Die Forscher hatten unterschiedliche Sichtweisen in der Analyse der Daten, inwieweit es einen Zusammenhang zwischen dem Ki67-Färbeindex und dem Grading, Staging und Lymphknotenstatus der Tumoren gab.

Wright und Kollegen haben im Jahr 1995, 105 Patienten mit Transitionalzellkarzinomen der Harnblase auf die Expression von p53, Rb und Ki67 untersucht (65). Der Ki67-Index variiert in seiner Arbeit von 1% - 47%. Es gab signifikante Unterschiede zwischen hohen Indices für schwach differenzierte (G3) Tumoren und niedrigen Indices für gute/moderate differenzierte Tumoren (G1/G2).

Valente 1999 konnte in seinen Untersuchungen von 102 Larynxkarzinomen keine Korrelation zwischen der Wachstumsfraktion, dem Grading und dem pathologischen Staging feststellen (59). Zu dem gleichen Ergebnis kommen Bettendorf und Hermann 2002. Sie fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Ki67 Färbeindex und den histologischen und klinischen Parametern nach der Untersuchung von 329 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (2). Im Jahr 2000 untersuchte Hantschmann 74 mit Ki67 angefärbte Plattenepithelkarzinomen der Vulva und entdeckte keinen Zusammenhang zu den klinischen Daten (11).

Zu einem anderen Ergebnis kam Tumuluri 2002 (56). Er unterstrich bei seinen Auswertungen über 42 orale Plattenepithelkarzinomen den Zusammenhang zwischen dem histologischen Brodersgrading und dem Mittelwert im Ki67 Färbeindex und ansteigendem Grading mit einem Long-Rank-Wert von $p=0,05$.

Zidar 1996 entdeckte in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen einem ansteigenden Grading und Prozentsatz von Ki67 positiv gefärbten Zellkernen ($p < 0,1$) nach der Untersuchung von 20 Plattenepithelkarzinomen des Larynx (69). Welkoborsky 1995 wies in seiner Arbeit an 40 Larynxkarzinomen nach, dass es einen Zusammenhang zwischen einem ansteigendem Ki67 Index und T1-Stadium und T4-Stadium gab (64).

Die Daten müssen durch eine größere Fallzahl evaluiert werden. Die biologische Aktivität des Krebsgewebes kann durch die immunhistochemische Färbung des Tumors mit Ki67 besser eingeschätzt werden. Eine Auswertung einer größeren Fallzahl wird nötig sein, auch in Zusammenhang mit anderen klinischpathologischen Parametern und Tumormarkern, um für jeden Patienten ein individuelles Risikoprofil zu erstellen und die Therapie darauf abzustimmen.

6. Zusammenfassung

Zwischen 1987 und 1990 erfolgte bei 120 Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom eine radikale Zystektomie. Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden immunhistochemisch mit den Markern Ki67 und p53 untersucht. Ki67 ist ein Proliferationsmarker, der die Wachstumsfraktion der Zellen markiert. p53 ist ein Protein, das unter anderem eine wichtige Rolle im Zellzyklusarrest bei DNA-Schäden und in der Induktion der Apoptose spielt. Von beiden Markern wurden die Indices ausgewertet (der relative Anteil der mit p53 und Ki67 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl). Zusätzlich wurde ebenfalls von beiden Kernmarkern die Farbintensität festgestellt auf einer Skala von null bis drei (null bedeutet keinerlei Markierung und drei eine sehr starke Markierung der Zellkerne).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen wurden von 88 Patienten mit den klinischen und histopathologischen Daten korreliert. Diese Daten umfassen das Alter, das Geschlecht der Patienten, das Tumorstadium, die Lymphknotenbeteiligung, das Auftreten von Fernmetastasen und den Differenzierungsgrad des Tumors.

Betrachtet man die Intensität der mit p53 markierten Kerne in Zusammenhang mit dem Tumorstadium, zeigt sich eine signifikante Korrelation mit einem $p=0,024$.

Die Korrelation der Intensität der mit den p53-Antikörper markierten Tumorzellkernen mit den restlichen Variablen (Lymphknotenstatus und Grading) zeigt keine Signifikanz. Auch die Korrelation der Intensität der mit dem Ki67 markierten Tumorzellkernen mit den gesamten Patientendaten zeigt keine Signifikanz bei einem $p>0,05$.

Die Korrelationen der Ki67- und p53-Indizes mit den Patientendaten zeigen ebenfalls keine Signifikanz bei einem $p>0,05$.

Um p53 als Biomarker für die Diagnostik und Prognostik oder als Ziel für weiterführende Therapien zu nutzen, ist nicht nur der immunhistochemische Nachweis des p53-Proteins im Gewebe notwendig, sondern zusätzlich eine akkurate Beurteilung der TP53 Mutation in dem Tumorgewebe nötig.

Ki67 kann in Zusammenhang mit anderen Markern ebenfalls ein nützlicher Marker für die Diagnostik und Prognostik der Harnblasenkarzinome sein.

7. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2002).
Interdisziplinäre kurzgefaßte Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Urologie.
AWMF-Leitlinienregister Nr. 032/038, Entwicklungsstufe 1
Harnblasenkarzinom

2. Bettendorf O, Herrmann G (2002).
Prognostic relevance of Ki-67-Antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinomas.
ORL-J-Otorhinolaryngol-Relat-Spec. 64:200-5

3. Börgermann C, vom Dorp F, Schenck M, Becker M, Heß J, Rübber H (2008).
Der Stellenwert der Target-Therapie beim Prostatakarzinom.
Der Urologe 47(10): 1315 - 19

4. Bol MGW, Baak JPA, van Dierman B, Buhr-Wildenhagen S, Janssen EAM, Kjellefold KH, Kruse AJ, Ogreid P (2003).
Proliferation markers and DNA content analysis in urinary bladder TaT1 urothelial cell carcinomas: identification of subgroups with low and high stage progression risks.
J. Clin. Pathol. 56: 447 - 52

5. Bol MGW, Baak JPA, Rep S, Marx WL, Kruse AJ, Bos SD, Kisman O, Voorhorst FJ (2002).
Prognostic Value of Proliferation Activity and nuclear Morphometry for Progression in TaT1 Urothelial Cell Carcinomas of the Urinary Bladder.
Elsevier Science Inc. Urology 60 (6): 1124 - 30

6. Cordon-Cardo C, Cote RJ, Sauter G (2000).
Genetic and molecular markers of urothelial premalignancy and malignancy.
Scand. Journal. Urol Nephrol Suppl. 205: 82 - 93
7. Cordon-Cardo C (1998).
Molecular Alterations in Bladder Cancer.
Cancer Surv. 31:115-31
8. Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Reuter V, Fair WR (1995).
Tumor Suppressor Gene Alterations In Bladder Carcinoma.
Advances in Urologic Oncology 4(2): 231 - 40
9. Frohneberg D (2007).
Muskelinvasives Harnblasenkarzinom.
Deutsches Ärzteblatt 104(13): 767-71
10. Goebell PJ, vom Dorp F, Rödel C, Frohnenberg D, Thüroff JW, Jocham D, Stief C, Roth S, Knüche R, Schmidt KW, Kausch I, Zaak D, Wiesner C, Miller K, Sauer R, Rübber H (2006).
Nichtinvasives und invasives Harnblasenkarzinom - Diagnostik und Therapie.
Der Urologe 45(7): 873-85
11. Hantschmann P, Lampe B, Beysiegel S (2000).
Tumor proliferation in squamous cell carcinoma of the vulva.
International Journal of Gynecol Pathol 19: 361 - 68
12. Hautmann R, Huland H (2006).
Urologie
3. überarbeitete Auflage Springer Verlag

13. Hautmann RE, Stenzl A, Studer UE, Volkmer BG (2007).
Geänderte Indikationen zur Harnableitung.
Deutsches Ärzteblatt 104(16): 973-78

14. Heidenreich A, Thüer D, Pfister D (2008).
Der Stellenwert der Targeted-Therapie beim Peniskarzinom.
Der Urologe 47(10): 1320 - 27

15. Helpap B, Schmitz-Dräger BJ, Hamilton PW, Muzzonigro G, Galosi AB, Kurth KH, Lubaroff D, Waters DJ, Droller MJ (2003).
Molecular pathology of non-invasive urothelial carcinomas (part I).
Virchows Arch 442: 309 - 16

16. Hinkal G (2007).
The cellular and molecular characterization of a p53 mutant mouse of accelerated aging.
Third International Workshop on Mutant p53 and Li-Fraumeni Symposium 2007: Short presentation 5.
http://www.p53.iarc.fr/P53meeting2007/Brochure_P53marathon2007_final.pdf. (Zuletzt abgerufen am 04.03.09)

17. Hurwitz MD (2002).
Bladder Cancer: Assessment and Management.
In: Encyclopedia of Cancer. Vol. 1, 2nd ed. USA: Elsevier Science, p. 205 - 12

18. Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ (2000).
Immunohistochemical expression of Retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma.
Histol Histopathol 15: 721 - 27

19. Jakse G, Stöckle M, Lehmann J, Otto T, Krege S, Rübber H (2007).
Metastasiertes Harnblasenkarzinom.
Deutsches Ärzteblatt 104(15): 910-14

20. Jerry DJ, Ozbun MA (2002).
TP53 Tumor Suppressor Gene: Structure and Function.
In: Encyclopedia of Cancer. Vol. 4, 2nd ed. USA: Elsevier Science p. 415 - 28

21. Krüger S, Thorns C, Stöcker W, Müller-Kunert E, Böhle A, Feller AC (2003).
Prognostic Value of MCM2 Immunoreactivity in Stage T1 Transitional Cell Carcinoma of the Bladder.
European Urology 43: 138 - 145

22. Lindemann-Docter K, Knüchel-Clarke R (2008).
Histopathologie des Harnblasemkarzinoms - Entscheidend für das Management der betroffenen Patienten.
Der Urologe 47(5): 627 - 37

23. Liukkonen T, Rajala P, Raitanen M, Rintala E, Kaasinen E, 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.
European Urology 36: 393 - 400

24. Lozano G (2007).
From bad to worse: p53 loss versus missense mutations.
Third International Workshop on Mutant p53 and Li-Fraumeni Symposium 2007: Lecture 21
http://www.p53.iarc.fr/P53meeting2007/Brochure_P53marathon2007_final.pdf. (Zuletzt abgerufen am 04.03.09)

25. Martinscheck A, Ruf CG, Sparwasser C, Schmelz HU (2008).
Der Stellenwert der Targeted-Therapie beim Hodentumor.
Der Urologe 47(10): 1328 - 33

26. Merseburger AS, Kuczyk MA (2008).
Der Stellenwert der Target-Therapie beim Nierenzellkarzinom.
 Der Urologe 47(10): 1303 - 10

27. Monti P, Ciribilli Y, Jordan J, Menichini P, Umbach DM, Resnick A, Luzzatto L, Alberto I, Fronza G (2007).
Transcriptional Functionality of Germ Line p53 Mutants Influences Cancer Phenotype.
 Clin. Cancer Res. 13: 3789 - 95

28. Montironi R, Lopez-Beltran A (2005).
The 2004 WHO Classification of Bladder Tumors: A Summary and Commentary.
 International Journal of Surgical Pathology 13(2): 143 - 53

29. Moonen L, Ong F, Gallee M, Verheij M, Horenblas S, Hart A, Bartelink H (2001).
Apoptosis, Proliferation and p53, Cyclin D1, and Retinoblastoma Gene Expression in Relation to Radiation Response in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder.
 Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 49(5): 1305-10

30. Olivier M, Hussain SP, Caron de FC, Hainaut P, Harris CC (2004).
TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer.
 IARC Sci Publ. 157: 247 - 70.

31. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymouth A, de Fromental CC, Hainaut P (2008).
Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective.
 Cancer Gene Therapy 1 - 12, Nature Publishing Group

32. Pschyrembel W (2007).
Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.
 261. Auflage, de Gruyter

33. Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR,
Savelieva E, Blelloch RH, Puthenveetil JA,
Cuthill S (1996).
A Molecular Genetic Model of Human Bladder Cancer Pathogenesis.
Seminars in Oncology 23(5): 571 - 84

34. Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero
J, Nogueira-March JL (2001).
**p53 and ki67 Expression as Prognostic Factors for Cancer-Related
Survival in Stage T1 Transitional Cell Bladder Carcinoma.**
European Urology 41: 182 - 89

35. Rohleder SE (2006).
**Bedeutung des Proliferationsmarkers MIB-1 für die individuelle
Überlebenszeitprognose bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen.**
Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheil-
kunde der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu
Tübingen

36. Ross W, Hall PA (1995).
Ki67: from antibody to molecule to understanding?.
Journal Clin Pathol: Mol Pathol 48: M113 - 17

37. Rübber H (2008).
**Einführung zum Thema: Target-Therapie - Kernschuss statt
Schrotschuss.**
Der Urologe 47(10): 1297

38. Rübber H (2007).
Harnblasenkarzinom - Auftakt zur Artikel-Serie.
Deutsches Ärzteblatt 104(11): 632-37

39. Saadatmandi N, Wilson DR, Gjerset RA (2002).
p53 Gene Therapy.
In: Encyclopedia of Cancer. Vol.3, 2nd ed. USA: Elsevier Science, p. 425 -
432

40. Sanchez Zalabardo D, Rosell Costa D, Fernandez Montero JM, Lopez Ferrandis J, Arocena Garcia-Tapia J, Jimenez Garin S, De Alava Casado E, Robles Garcia JE, Zudaire Bergera JJ, Berian Polo JM (2002).
Valor Prognostico De La p53, Ki67 Y La Proteina Rb En Los Tumores Vesicales Infiltrantes.
 Actas Urologicas Espanolas 26(2) : 98 - 103

41. Sauter G (2004).
Toumours of the Urinary System.
 In: Sauter G, Eble JN, Epstein JI, Sesterhenn IA (ed). WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 1st. ed. Lyon: IARC Press, p. 90 - 157

42. Schmidt KW (2008).
Molekularpathologische Bestimmung prädiktiver Biomarker. Eine neue Aufgabe der diagnostischen Pathologie.
 Der Urologe 47(10): 1298 -1302

43. Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C (2005).
Harnblasentumoren - Die neue WHO-Klassifikation 2004.
 Der Urologe 44(9): 1073 -86

44. Senzer N, Nemunaitis J, Nemunaitis M, Lamont J, Gore M, Gabra H (2007).
p53 Therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome.
 Mol. Cancer Ther. 6: 1478 - 82

45. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR (2001).
Antigen Retrieval Immunohistochemistry and Molecular Morphology in the Year 2001.
 Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology 9(2): 107 -16

46. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR (2001).
Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives.
 The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 49(8): 931 - 37

47. Shi S-R, Cote RJ, Yang C, Chen C, Xu H-J, Benedict WF, Taylor CR (1996).
Development of an optimal Protocol for Antigen retrieval: A "Test Battery" approach exemplified with Reference to the Staining of Retinoblastoma Protein (pRB) in Formalin-Fixed Paraffin Sections.
 Journal of Pathology 179: 347 -52

48. Slaton JW, Benedict WF, Dinney CPN (2001).
p53 in Bladder Cancer: Mechanism of Action, Prognostic Value, and Target for Therapy.
 Urology 57: 852 - 859

49. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A (2003).
Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.
 Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 8418 - 23.

50. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ (1998).
Prognostic Markers in Bladder Cancer: A Contemporary Review of the Literature.
 The Journal of Urology 160: 645 - 59

51. Stief C, Zaak D, Stöckle M, Studer U, Knuechel R, Rödel C, Sauer R, Rübben H (2006).
Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms - Standards und Perspektiven.
 Der Urologe 45(Sonderheft): 90 - 5

52. Stöckle M, Lehmann J, Krege S, Gschwend JE, Otto T, Rübben H (2007).
Therapie und Prognose des lymphogen metastasierten Harnblasenkarzinoms.
 Deutsches Ärzteblatt 104(14): 852-6

53. Theobald M (2007).
Targeting p53 by T cells.
Third International Workshop on Mutant p53 and Li-Fraumeni Symposium
2007: Lecture 25.
http://www.p53.iarc.fr/P53meeting2007/Brochure_P53marathon2007_final.pdf. (Zuletzt abgerufen am 04.03.09)
54. Tomovska S, Richter J, Süess K, Wagner U, Rozenblum E, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G, Schraml P (2001).
Molecular cytogenetic alterations associated with rapid tumor cell proliferation in advanced urinar bladder cancer.
International Journal of Oncology 18: 1239 - 44
55. Tritschler S, Zaak D, Knuechel R, Stief CG (2006).
Urinzytologie und Urinmarker - Bedeutung für die Praxis.
Der Urologe 45(11): 1441 - 48
56. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS (2002).
Analysis of the Ki-67-Antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma.
Journal-Oral-Pathol-Med 31: 598 - 604
57. Turzinski, Gocht (2008).
Das Ki67-Antigen.
<http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Antikörper/K.../ki67html> (Zuletzt abgerufen am 25.04.2007)
58. Turzinski, Gocht (2008).
p53.
<http://www.pathologen-luebeck.de/Methode/Immunhistologie/Antikörper/p53/p53.html> (Zuletzt abgerufen am 25.04.2007)

59. Valente G, Orrechia R, Gandolfo S (1994).
Can Ki67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma?
 Journal-Clin-Pathol. 47: 109 - 12

60. Verheijen R, Kuipers HJ, Schlingemann RO (1989).
Ki67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase.
 J Cell Sci 92 (Pt. 1): 123 - 30

61. Vom Dorp F, Börgermann C, Rose A, Becker M, Rübber H (2008).
Tageted-Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms.
 Der Urologe 47(10): 1311 -14

62. Vom Dorp F, Kausch I, Jocham D (2007).
Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms.
 Deutsches Ärzteblatt 104(12): 702-7

63. Vousden KH (2007).
Role of p53 in apoptosis and authophagy.
 Third international Workshop on Mutant p53 and Li-Fraumeni Symposium 2007: Lectur 12.
http://www.p53.iarc.fr/P53meeting2007/Brochure_P53marathon2007_final.pdf
 df.(zuletzt abgerufen am 04.03.09)

64. Welkoborski HJ, Hinni M, Dienes HP (1995).
Predcting recurrence and survival in patients wirh laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading and prolifertion markers.
 Ann-Otol-Rhinol-Laringol 104: 503 - 10

65. Wright D, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Wilson Horne CH (1995).
Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation with Ki67 index.
 British Journal of Urology 75: 173 -9

66. Yu MC, Ross RK (2002).
Bladder Cancer: Epidemiology.
In: Encyclopedia of Cancer. Vol. 1, 2nd ed. USA:Elsevier Science, p. 215 - 21
67. Zaak D, Tritschler S, Knuechel R, Vom Dorp F, Hakenberg OW, Hautmann S, Rübben H (2006).
Die Urinzytologie - Möglichkeiten, Grenzen und Zukunft.
Der Urologe 45(Sonderheft): 97 - 101
68. Zieger K, Wolf H, Olsen PR, Hojgaard K (1998).
Long-term survival of patients with bladder tumors: the significance of risk factors.
British Journal of Urology 82: 667 -72
69. Zidar N, Gale N, Cor A (1996).
Expression of Ki-67-Antigen an proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx.
Journal Laryngol Otol 110: 440 - 5

8. Anhang

Nr.	Block Nr.:	p53 Intensität	p53 Index	Ki67 Intensität	Ki67 Index	p53 G.-zellen 1/2 Gesichtsfeld	p 53 pos. Kerne 1/2 Gesichtsfeld	Ki67G.-zellen 1/2 Gesichtsfeld	Ki67 pos. Kerne 1/2 Gesichtsfeld	pT	N	M	G	TUMORTYP	GEBDAT	SEX	OPDAT
1	12533icEP	2,00	20,97	2,00	8,08	124	26	198	162	0	0	0	2	UROTHEL-CA.	17.11.24M		26.05.87
2	13029ic	3,00	56,72	3,00	16,95	134	76	118	202	0	0	0	3	UROTHEL-CA.	18.08.23W		02.06.87
3	14753la	0		2,00	3,88	0	0	206	82	X	X	1	X		10.01.25M		25.06.87
4	16172Vdp	3,00	2,86	0	0	280	8	0	02	0	0	0	1	UROTHEL-CA.	16.12.28M		13.07.87
5	17888VleE	2,00	21,14	1,00	1,52	246	52	132	2X	X	X	X	X		X	X	X
6	19810ld	0	0	2,00	18,31	0	0	71	133B	2	0	3		GROSSZELLIGES CA.	06.06.21W		20.07.90
7	20164lllc	0	0	0	0	0	0	0	03A	0	0	2		UROTHEL-CA	13.12.45M		01.09.87
8	20923loE	0	0	3,00	17,39	0	0	230	402	0	0	2		UROTHEL-CA	08.08.28M		10.09.87
9	2665lfg	0	0	2,00	14,00	0	0	150	212	0	0	2		UROTHEL-CA	05.09.26W		02.02.87
10	27280llle	2,00	2,27	2,00	1,10	176	4	272	31	0	0	X		PLATTENEPITHEL+UROTHEL-CA	22.04.32M		17.11.87
11	27552Vb	2,00	2,63	3,00	15,63	114	3	32	52	0		2		UROTHEL-CA	23.10.14M		23.11.87
12	3970IVh	3,00	69,58	2,00	2,78	309	215	180	53	1	0	2		UROTHEL-CA	23.10.17M		16.02.87
13	7126lh	0	0	3,00	1,65	0	0	242	43A	0	0	2		UROTHEL-CA	01.12.41M		23.03.87
14	8785IVb	0	0	2,00	8,76	0	0	137	123A	0	0	3		UROTHEL-CA	05.10.18W		03.04.87
15	9669VIIlj	0	0	0	0	0	0	0	0X	X	X	X	X		X	X	X
16	10348IIE	0	0	0	0	0	0	0	03B	0	0	3		UROTHEL-CA, PLATTENEPITHEL METAPLASIE	05.07.16M		12.04.88
17	1132lk	0	0	0	0	0	0	0	04	0	0	2		ADENO-CA	01.05.35W		12.01.88
18	11340Vhp	3,00	15,33	1,00	10,10	150	23	99	103A	0		3		UROTHEL-CA	15.02.21M		25.04.88
19	11803IVf	2,00	55,47	2,00	15,79	128	71	76	123B	0	0	3		UROTHEL-CA	29.08.19M		28.04.88
20	13543c	3,00	45,63	0	0	206	94	0	0X	X	X	X	X		X	X	X
21	14284Vlj	3,00	70,75	2,00	21,43	147	104	84	184	2	0	3		UROTHEL-CA	13.12.36M		26.05.88
22	14437elll	0	0	0	0	0	0	0	03A	0	0	3		UROTHEL-CA	14.05.28M		27.05.88
23	14621Va	0	0	0	0	0	0	0	02	0	0	2		UROTHEL-CA	14.09.24M		30.05.88
24	14737Vb	3,00	51,58	0	0	190	98	0	04	0	0	3		UROTHEL-CA	09.02.24M		31.05.88
25	15635IVg	0	0	1,00	2,89	0	0	242	72	0	0	2		UROTHEL-CA	21.06.18M		09.06.88

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.