

Aus der Urologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel

Her2/neu-Genexpression auf mRNA-Ebene im muskelinvasiven
Urothelkarzinom: prognostische Rolle und Validität

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Doron Benjamin Stein

aus
Bonn
2018

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: PD. Dr. med. Philipp Erben

In Dankbarkeit meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase	2
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.2 Klassifikation	2
1.1.3 Klinik	4
1.1.4 Diagnostik	4
1.1.5 Therapie	5
1.1.6 Prognose	5
1.2 Her2 als Epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor	6
1.2.1 Funktion und Regulierung	6
1.2.2 Mechanismen der Her2-Überexpression	7
1.2.3 Diagnostische Methoden zur Her2-Detektion	8
1.2.4 Her2-Status in anderen Tumorentitäten	10
1.2.5 Her2-Status im Urothelkarzinom	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit	12
2 METHODEN UND PATIENTENKOHORTE	13
2.1 Methoden	13
2.1.1 Patientenkohorte	13
2.1.2 Nomenklatur	13
2.1.3 Zellkultur	14
2.1.4 RNA-Extraktion aus Zelllysaten	15
2.1.5 RNA-Extraktion aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben	16
2.1.6 Klonierung externer Standards für die RT-PCR	16
2.1.7 cDNA-Synthese	18
2.1.8 Real-Time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion	19

2.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2	Statistik.....	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Patientenkohorte	24
3.2	Optimierung RT-PCR	25
3.2.1	Klonierung geeigneter Standards.....	26
3.2.2	Standard-Performance.....	27
3.2.3	Inter- und Intra-Assay-Variabilität.....	28
3.3	Ergebnisse der RT-PCR	29
3.3.1	Deskriptiv.....	29
3.3.2	Nach klinischen Eigenschaften der Patienten.....	31
3.3.3	Überlebensanalyse	34
3.3.4	Interlaborvergleich.....	36
4	DISKUSSION.....	40
4.1	Prognostische Rolle von Her2 im Urothelkarzinom.....	40
4.1.1	Klinische und histopathologische Parameter	40
4.1.2	Her2-spezifisches Tumorüberleben	41
4.2	Die RT-PCR als Methode zur Evaluation des Her2-Status.....	42
4.3	Ausblick.....	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	51
7	TABELLARISCHER ANHANG	60
7.1	Material.....	60
7.1.1	Geräte	60
7.1.2	Verbrauchsmaterial	60
7.1.3	Kits und Chemikalien	61
7.1.4	Zelllinien	62

7.1.5	Oligonukleotide	63
7.1.6	Plasmide.....	63
7.2	Publikationen.....	64
7.3	Weitere Abbildungen und Tabellen	64
8	LEBENS LAUF	66
9	DANKSAGUNG	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Calm	Calmodulin
CNV	Copy Number Variation
CSS	Cancer-specific Survival
CV	Coefficient of Variation
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DSS	Disease Specific Survival
EGF	Epidermal Growth Factor
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
G	Tumor-Grade
GADPH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
Gus	β -Glucuronidase
IHC	Immunhistochemie
LVI	Lymphovaskuläre Invasion
M	Metastasierungsstatus
MIBC	Muscle-Invasive Bladder Cancer
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus isolierte Reverse Transkriptase
N	Lymphknotenstatus
NRG	Neuregulin
NMIB	Non Muscle-Invasive Bladder Cancer
pR	pathologischer Resektionsstatus
pT	pathologischer Tumorstatus
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PGK	Phosphoglycerokinase
PUNLMP	Papilläre Neoplasie mit niedrig malignem Potential
RFS	rezidivfreies Überleben
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF α	Tumor Growth Factor α
T-DM1	Trastuzumab-Emtansin
TUR-B	transurethrale Resektion der Blase
UICC	Union for International Cancer Control

1 EINLEITUNG

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Das Harnblasenkarzinom ist verantwortlich für 3,1% der Krebssterbefälle in Deutschland. Es belegt Platz vierzehn der häufigsten Tumorlokalisationen der Frau und Platz vier der häufigsten Lokalisationen des Mannes. Jährlich erkranken ca. 12.000 Männer und 4000 Frauen im Bundesgebiet, was einem dreifach höheren Risiko für Männer entspricht.¹ Das Harnblasenkarzinom ist eine Tumorerkrankung des höheren Lebensalters: Über 70% der Karzinome werden erst nach dem 65. Lebensjahr diagnostiziert. Weltweit schwankt die Inzidenz stark. Industrieländer haben eine sechsmal höhere Inzidenz als Entwicklungsländer.²

Es sind diverse Risikofaktoren für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms bekannt. Allen voran gilt Nikotinabusus als Hauptrisikofaktor.³ Es wird geschätzt, dass 66% der Harnblasenkarzinome beim Mann und 30% bei der Frau auf Rauchen zurückgeführt werden können. Generell steigt das Risiko mit steigender Anzahl der Pack-Years, wiederum sinkt es nach Beendigung des Rauchens.⁴ Darüber hinaus wird eine Exposition mit krebserregenden Stoffen der Chemieindustrie als ursächlich für Harnblasenkrebs angesehen.^{3, 5} Inzwischen wurden über 50 verschiedene Substanzen als risikosteigernd identifiziert. Vor allem die u.a. in der Farbstoffsynthese vorkommenden aromatische Amine Beta-Naphthylamin, Benzidin und 4-Aminodiphenyl (Xenylamin) werden inzwischen auch von der Berufsgenossenschaft als berufsbedingte Karzinogene eingestuft.⁶ Auch mit Arsen angereichertes Trinkwasser sowie Arzneimittel, wie Cyclophosphamid und Pioglitazon, gelten als isolierte Risikofaktoren sowie eine chronische Infektion des Harntrakts mit *Schistosoma haematobium* mit fibrotischem Umbau der Blase (Bilharziose).⁷

1.1.2 Klassifikation

In über 90% der Fälle geht das Harnblasenkarzinom vom Urothel der Blase aus, bei weiteren 5% handelt es sich um Plattenepithel-, Adeno- oder andere Karzinome.⁵ Während ca. 75 - 85 % der Urothelkarzinome papillär-exophytisch wachsen (NMIBC,

non muscle-invasive bladder cancer) und ein geringes Malignitätspotential aufweisen, haben *in situ* befindliche und muskel-infiltrierende (MIBC, muscle invasive bladder cancer) Tumoren eine schlechtere Prognose.^{5, 8} Es werden zwei Klassifikationssysteme zur Charakterisierung von Urothelkarzinomen angewandt: Staging und Grading. (Abb. 1) Das Staging beschreibt den Grad der Ausbreitung des Tumors und erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der World Health Organisation.⁹ (Tab. 1)

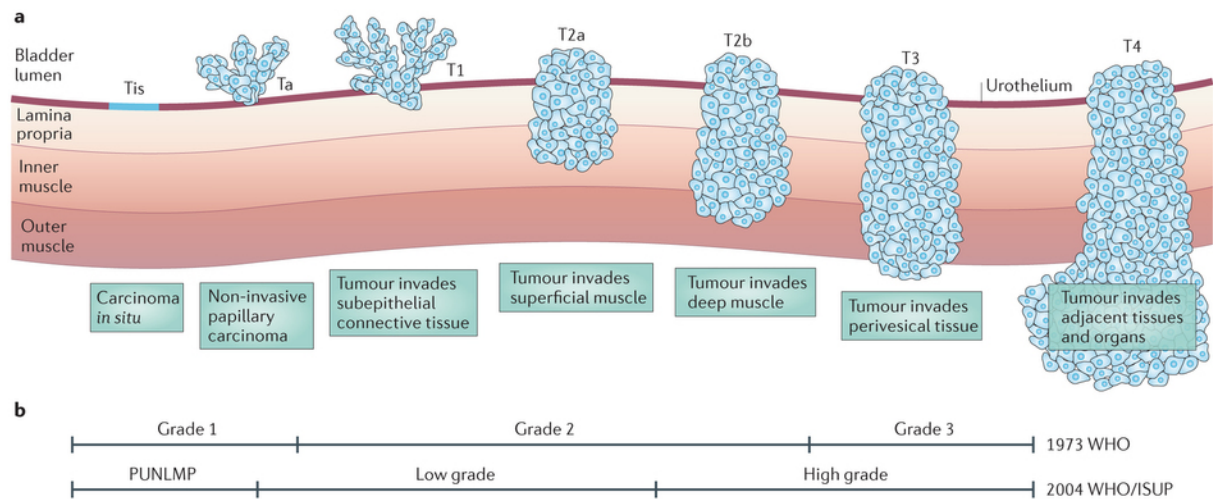
Tabelle 1: Staging nach TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms

TNM-Stadium	Ausdehnung
pTa	Nicht-invasives papilläres Karzinom
Tis	<i>Carcinoma in Situ</i> , flach nicht-invasiv
T1	Infiltration bis in die Lamina submucosa
T2	Infiltration bis in die Lamina muscularis
T3	Infiltration der Niere, des perirenenalen oder periurethralen Fettgewebes
T4	Infiltration von Nachbarorganen
N0	Keine LK-Metastasen
N1	Regionale LK-Metastasen solitär: < 2cm
N2	Regionale LK-Metastasen solitär 2-5cm oder multipel < 5cm
N3	Regionale LK-Metastasen < 5cm
M0	Keine Metastasierung
M1	Fernmetastasen

Das Grading beschreibt den histologischen Differenzierungsgrad des Tumorgewebes und die damit einhergehende Malignität und erfolgt nach der Klassifikation der American Joint Committee on Cancer (AJCC) und der Union for International Cancer Control (UICC).¹⁰ (Tab. 2)

Tabelle 2: Auflistung der histologischen Grading-Stadien von Urothelkarzinomen

Grading-Stadium	Differenzierungsgrad
Urotheliales Papillom	Benigner Tumor
Papilläre Neoplasie mit niedrig malignem Potential (PUNLMP)	Benigner Tumor, aber histologisch maligne Zeichen
Low-grade Karzinom	Entspricht G1-Tumor (gut differenziert)
High-grade Karzinom	Entspricht G2-G3-Tumor (mäßig – schlecht differenziert)



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 1: Staging und Grading des Urothelkarzinoms. Zeigt papilläres Wachstum der nicht-muskelinvasiven Tumoren und Invasion in tiefere Schichten von Tis bis T4 sowie den Zusammenhang mit den Grading-Klassifikationen von 1973 und 2004.¹¹ Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.: Nature Reviews Cancer, Copyright 2014.

1.1.3 Klinik

Das Harnblasenkarzinom äußert sich in 80% der Fälle durch eine schmerzlose Hämaturie.⁸ Je nach Lokalisation und Ausdehnung des Tumors kann es zu einer Verdrängung des harnspeichernden Blasenvolumens oder/und einer Verlegung der ableitenden Harnwege kommen, was einen gesteigerten Harndrang (Pollakisurie) oder erschwerte Blasenentleerung (Dysurie) zur Folge hat. Ebenso können in späteren Stadien Nierenstauung mit Flankenschmerz, B-Symptomatik und metastasenbedingte Knochenschmerzen sowie chronische Harnwegsinfekte auftreten.¹²

1.1.4 Diagnostik

Neben bildgebenden Verfahren, wie Harnblasensonografie und Pyelographie mittels Röntgen, steht vor allem die Urethrozystoskopie im Mittelpunkt der Diagnoseverfahren. Dabei können Lokalisation, Anzahl und Ausdehnung der Tumoren ermittelt werden. Darüber hinaus ist eine zytologische Untersuchung mit aus dem Urin gewonnenen Urothelzellen v.a. für die Detektion von high-grade-Karzinomen eine sensitive Methode.⁵ Eine photodynamische Diagnostik kann durch Instillation eines Fluoreszenzfarbstoffes (Hexaminolaevulinat), der hochproliferative Bereiche der Blase anfärbt, die Lokalisierung schwer sichtbarer *in situ* Tumoren erleichtern.^{13, 14}

1.1.5 Therapie

Bei nicht-invasiven pTa- und pT1-Tumoren (NMIBC) wird zunächst eine transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) durchgeführt. Diese dient gleichzeitig zur histologischen Befundsicherung und kann bei Bedarf mehrfach wiederholt werden.⁵ Im Anschluss wird eine Instillation mit Mitomycin oder einem der Anthrazykline Epirubicin und Doxorubicin empfohlen. Beim nicht-invasiven, diffus wachsenden *Carcinoma in Situ* ist die Instillation von Bacillus Calmette-Guérin in die Harnblase die Therapie erster Wahl.^{5, 15, 16}

Therapieresistente oberflächliche Karzinome sowie muskelinvasive (ab pT2) Tumoren (MIBC) werden durch eine radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie und Harndeviation behandelt.¹⁷ Die Ableitung des Urins kann dabei durch einen vorzeitigen Austritt durch die Bauchdecke (Ileumkonduit) oder einen Blasenersatz aus Dünndarmanteilen (Neoblase, Pouch) erfolgen.^{17, 18} Perioperativ wird eine (neo-)adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabin empfohlen.^{15, 19-21} Zielgerichtete Antikörpertherapien gegen den Wachstumsfaktorrezeptor Her2 oder andere immunmodulatorische Rezeptoren, wie den Programmed Death Ligand 1 (PD-L1,) sind bislang nicht etabliert, es existieren jedoch bereits erste Zulassungen.²²

1.1.6 Prognose

Die Prognose des Urothelkarzinoms hängt ab von Ausbreitung und Infiltration des Tumors sowie vom histologischen Differenzierungsgrad. Die 5-jahres Überlebensraten sind in Tabelle 3 dargestellt.^{23, 24}

Tabelle 3: 5-Jahres-Überlebensraten des Urothelkarzinoms nach T-Stadium

Tumor-Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
T1	80%
T2	60%
T3	30-50%
T4	20%

Problematisch am Urothelkarzinom sind v.a. hohe Rezidivraten von 30 bis 80 %, die in einer hohen Operationshäufigkeit und strikten Nachsorgeroutine resultieren und damit auch eine gesundheitsökonomische Relevanz aufweisen.

Für die Rezidiv-Neigung des Urothelkarzinoms haben sich zwei Theorien etabliert: Eine Erklärung ist, dass Urotheltumoren häufig auf der Basis von Genabberationen oder Kanzerogenläsionen entstehen, die weitgefächerte Segmente der Blase betreffen (sog. Feldkanzerisierung). So haben Patienten häufig mehrere Primärtumoren oder nach Resektion eines ersten Tumors neu auftretende Raumforderungen an anderen Stellen der Blase.²⁵ Die Reimplantationshypothese dagegen sieht die Neuansiedlung von intraluminal gestreuten monoklonale Tumorzellen als Ursache für Rezidive: durch intraluminale Aussaat oder intraepitheliale Migration können sich von einer Ursprungszelle ausgehende Tumorzellen an weiter distal gelegenen Segmenten des Harntrakts („downstream“) anhaften.^{26, 27}

1.2 Her2 als Epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor

1.2.1 Funktion und Regulierung

Der Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Her2/neu (im Folgenden als Her2 bezeichnet) ist der zweite von vier epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren, den sog. Her-Rezeptoren (syn. ErbB-Rezeptoren), und spielt eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion.^{28, 29} Wie alle epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren besteht er aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranösen Domäne und einer zytosolischen Domäne, die über Interaktion mit diversen Signalmolekülen intrazelluläre Signalwege in Gang setzt.^{30, 31} Her2 wird codiert durch das Her2-Gen, welches auf Chromosom 17 lokalisiert ist.³²

Voraussetzung für die Ligandenbindung von Her2 ist eine Heterodimerisierung mit einem weiteren Her2-Rezeptor oder mit den anderen Rezeptoren der Her-Familie Her1, Her3 und Her4. Je nach Dimerisierungspartner können verschiedene Liganden mit unterschiedlicher Bindungsstärke am Rezeptorpaar binden. Entsprechende Liganden sind u.a. Epidermal Growth Factor (EGF), Tumor Growth Factor α (TGF α) und Neureguline (NRGs).³³ Die Signalweiterleitung erfolgt anhand verschiedener Signalwege, die ebenfalls von Liganden und Dimerisierungspartner abhängen. Vom Her2-Rezeptor verstärkte Signalwege beinhalten die drei proliferativ bedeutsamen Signalwege MAP-Kinase-Weg, JAK-STAT-Weg und PI3-Weg.³²⁻³⁴

Her2 beeinflusst die Regulierung von Zellproliferation, -differenzierung und -stoffwechsel und verhindert die Initiierung der Apoptose.^{30, 35} Da eine Deregulierung des Rezeptors durch Amplifikation oder Mutation zellproliferative Veränderungen mit sich bringt, wird Her2 als Onkogen bezeichnet.

1.2.2 Mechanismen der Her2-Überexpression

Eine Überexpression des Her2-Rezeptors auf der Zelloberfläche kann durch diverse Mechanismen verursacht werden.

Eine häufige Ursache liegt in einer Genamplifikation des Her2-Gens.³⁶ Im Urothelkarzinom konnte schon früh eine Assoziation zwischen Genamplifikation und Überexpression des Her2-Rezeptors nachgewiesen werden.³⁷ Quantitative Veränderungen von Onkogenen spielen eine wichtige Rolle in fast jeder bekannten Tumorentität und werden hervorgerufen durch ungleiches Crossing-Over homologer Chromosomen.

Weiterhin können Mutationen oder Translokationen eines Gensegments zu einer verstärkten Transkription des Gens führen. Bei Ratten konnte eine einzelne Punktmutation als Auslöser für eine Her2-vermittelte unkontrollierte Zellproliferation identifiziert werden.³⁸ Translokationen können in ihrer Extremform als Fusionsgene zur okogenen Aktivierung führen. Fusionsgene entstehen durch Verknüpfung zweier Genabschnitte verschiedener Chromosomen. Es sind einige Fusionsgene für Her2 beschrieben. Im Urothelkarzinom sind dies ERBB2-DIP2B und ERBB2-GRB7, wobei für das Erstere eine Her2-Überexpression beschrieben ist.^{39, 40}

Auch Veränderungen der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren haben direkten Einfluss auf den Expressionsverlauf von Proteinen.⁴¹ Allerdings führen Alterationen an den Transkriptionsfaktoren im Wesentlichen zu einem Proliferationsstop oder zur Apoptoseinduktion (s. p53, p21, PTEN, etc.), weshalb die Zielgene vieler bekannter Transkriptionsfaktoren auch als Tumorsuppressorgene bezeichnet werden.

Außerhalb der Transkriptionsebene kann eine gesteigerte Translation die Ursache für erhöhte Expressionsraten sein. In Mamma- und Magenkarzinom konnte unter anderem Lin28, ein mRNA-Bindungsprotein, ursächlich für eine gesteigerte Translation des Her2-Rezeptors identifiziert werden.^{42, 43}

Darüber hinaus können epigenetische Faktoren oder veränderte Ligandenkonzentra-

tionen und –bindungsaffinitäten die Rezeptoraktivität beeinflussen, was ebenfalls eine Deregulierung von Oberflächenrezeptoren zur Folge haben könnte. Sowohl auto-, als auch parakrine Aktivierungswege von Her2 wurden bereits für andere Tumorentitäten beschrieben.^{44, 45}

1.2.3 Diagnostische Methoden zur Her2-Detektion

Es existieren verschiedene Methoden, Amplifikation und Expression von Her2 zu messen. Die bei weitem gebräuchlichste Methode zur Bestimmung des Proteinexpressionsstatus ist die Immunhistochemie (IHC). Die Bestimmung des Genamplifikationsstatus erfolgt in der Regel mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH). Eine Analyse des Expressionsstatus auf mRNA-Ebene ist mit einer Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) möglich.

1.2.3.1 Immunhistochemie und Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

Sowohl IHC als auch FISH haben sich in der Routinediagnostik des Mammakarzinoms durchgesetzt. Die IHC nutzt mono- oder polyklonale Antikörper, die gegen den Her2-Rezeptor gerichtet sind und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden können.⁴⁶ Für die Expressionsanalyse von Her2-Rezeptorproteinen auf Mammakarzinomzellen mittels IHC wurde bereits 2007 von der American Society of Clinical Oncology (ASCO) ein Färbestandard empfohlen, für die Analyse auf Urothelkarzinomzellen existieren keine Empfehlungen.⁴⁷ Für die Amplifikationsanalyse mittels FISH werden Fluoreszenz-markierte DNA-Einzelstrangsonden verwendet, die an den Her2-Genabschnitt auf Chromosom 17 binden und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können.⁴⁸

Trotz ihrer verbreiteten Nutzung haben IHC und FISH eine geringe Konkordanz bzgl. ihrer Ergebnisse. Sowohl im Mamma-, als auch im Urothelkarzinom werden immer wieder Unterschiede zwischen Amplifikations- und Expressionsgrad gleicher Tumoren festgestellt. Es wird diskutiert, ob Mechanismen der Her2-Überexpression auf posttranskriptioneller Ebene für diese Diskrepanz verantwortlich sind.⁴⁹ Gleichzeitig besitzt insbesondere die IHC eine hohe Inter-Observer-Variabilität.⁵⁰ Die quantitative Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion wird als mögliche sensitivere Alternative zur IHC angesehen, auch durch ihre Möglichkeit zur Standardisierung und Automatisierung.^{51, 52}

1.2.3.2 Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Die Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren, mit dem RNA nachgewiesen werden kann. Sie besteht aus zwei Schritten. Zunächst wird die vorliegende Ziel-RNA mittels einer Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT entstammt modifizierten Retroviren und entspricht in ihrer Funktion einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, besitzt jedoch zusätzlich eine hydrolytische Ribonuklease-Domäne. Als Primer können Gen-unspezifische Oligo-dT-Primer verwendet werden, die am Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden.⁵³ Alternativ können Random Hexamere oder sequenzspezifische Primer genutzt werden.^{54, 55} Im Zweiten Schritt wird die cDNA in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Hierzu wird heutzutage üblicherweise entweder eine qualitative PCR mit anschließender Gelelektrophorese oder eine quantitative Real-Time PCR (TaqMan PCR) verwendet, die mit Hilfe beigefügter Fluoreszenzsonden das entstandene PCR-Produkt simultan quantifiziert. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist (Reporter). Das 3'-Ende trägt ein Fluoreszenz-auslöschendes Molekül (Quencher). In der stabilen ungebundenen Form der Sonde wird das Fluoreszenzsignal durch die räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffes mittels Energieübertragung zum Quencher ausgelöscht. In der Elongationsphase der PCR wird die zuvor an die DNA gebundene Sonde durch die Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase gespalten und der Reporter-Farbstoff entfernt sich von seinem Quencher. Dies setzt das Fluoreszenzsignal frei.^{56, 57} (Abb. 2)

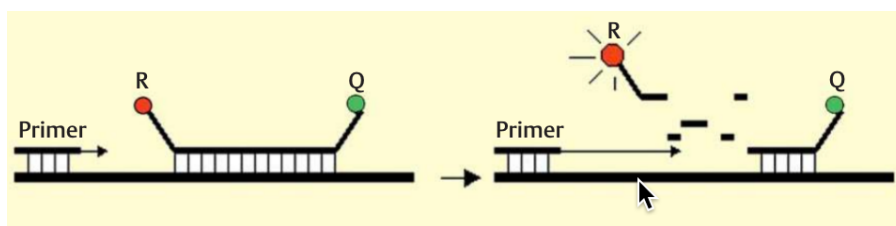


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sondenmechanismus. Die Sonde trägt an ihren Enden je einen Reporter (R) und einen Quencher (Q). Bei der Zersetzung der Sonde durch die DNA-Polymerase (nicht abgebildet) entfernen sich Reporter und Quencher räumlich voneinander, was das Fluoreszenzsignal freisetzt.⁵⁸ Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Wiley-VCH GmbH & CoKG: Biologie in unserer Zeit, Copyright 2007.

Die Quantifizierung der Fluoreszenz kann relativ, durch Abgleich der Signale untereinander, oder absolut, durch Abgleich der Signale der Ziel-DNA mit denen von parallel mitamplifizierten Standard-Verdünnungsreihen, erfolgen. Diese enthalten zuvor durch

Verdünnung abgestufte, exakt bestimmte DNA-Konzentrationen, anhand derer auch die Kopienanzahl der Ziel-DNA berechnet wird.

Zur klinischen Patientenselektion im Sinne eines Rule-in für spezifizierte Therapien wird die RT-PCR auf mRNA-Basis vorwiegend für onkologische Therapieentscheidungen bei Mamma- und Prostatakarzinomen angewandt.^{59, 60} Für die Diagnostik im Urothelkarzinom ist die RT-PCR in etablierten klinischen Abläufen hinter IHC und FISH bislang eher zweitrangig.

1.2.4 Her2-Status in anderen Tumorentitäten

Der Status von Her2 hat seit den 1990er Jahren einen etablierten Stellenwert in Diagnostik und Therapie des Mamma-Karzinoms eingenommen. Ca. 15-30% der Brustkrebs-Tumoren zeigen erhöhte Amplifikations- oder Expressionswerte, die gleichzeitig mit einer schlechteren klinischen Prognose korrelieren und daher als Ursprung einer onkogenen Transformation angesehen werden.^{61, 62} Durch die Gabe des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab kann in Her2-überexprimierten Patienten die Prognose um 20% verbessert werden.⁶² Dies gilt auch für andere Tumorentitäten, wie Magen-, Ovarial- und Uteruskarzinome. Insbesondere beim Magenkarzinom, bei dem eine Überexpressionsrate von durchschnittlich 19% festgestellt werden konnte, wurde Trastuzumab ebenfalls als adjuvante Behandlungsoption etabliert. Hier konnte die Prognose um 35% % verbessert werden.⁶³ Sowohl im Mamma- als auch im Magenkarzinom korrelieren hohe Expressionsraten mit erhöhten Amplifikationsraten.⁶³⁻⁶⁵ Es ist daher wahrscheinlich, dass die Überexpression auch Folge einer Genamplifikation ist.

1.2.5 Her2-Status im Urothelkarzinom

Insgesamt ist der Her2-Status im Urothelkarzinom nicht abschließend geklärt. Ein klarer Zusammenhang zwischen Amplifikation und Expression wie in Magen- und Mammakarzinom besteht jedoch nicht. Sowohl Genamplifikationsrate als auch Überexpressionsrate des Her2-Rezeptors im Urothelkarzinom variieren stark. Bezüglich einer Korrelation zwischen Amplifikation und Überexpression existieren bislang ebenfalls diskrepante Daten.^{66, 67} In der Literatur wird eine Amplifikationsrate von 0 bis 32% angegeben, während die Überexpression zwischen 9 und 80% liegt.⁶⁷⁻⁶⁹ Dar-

über hinaus werden für einzelne urothelialen Tumorsubtypen Mutationen beschrieben.³⁹ Dennoch sind verschiedene Therapiestudien bislang negativ.⁷⁰ Die Diskrepanz der Expressions- und Amplifikationswerte im Urothelkarzinom legt nahe, dass für die negativen Ergebnisse Her2-Alterationen ursächlich sind, die nicht allein durch IHC und FISH detektierbar sind.

Bezüglich klinischer und histopathologischer Merkmale sind bisher keine eindeutigen Zusammenhänge bekannt: Dabei korreliert der Expressionsgrad mit dem Differenzierungsgrad (Grading) der Tumorzellen, d.h. stärkere Expression bei höhergradigen Tumoren (G3), aber nicht mit dem Ausbreitungsgrad (Staging).^{71, 72} Ebenso zeigen Lymphknotenmetastasen stärkere Amplifikations- und Expressionsgrade als ihre Primärtumoren.^{73, 74} Untersuchungen nach Invasivität und Fernmetastasen existieren bislang nicht.

Die prognostische Relevanz von Her2 im Blasenkrebs ist ebenfalls nicht eindeutig. Die Überexpression des Rezeptors zeigte in einer Studie mit muskelinvasiven Tumoren keinen Zusammenhang mit dem Todeszeitpunkt der Patienten.⁷³ Eine andere Studie hingegen ergab nach multipler Regression der Prädiktionsfaktoren, dass der Her2-Expressionsstatus als unabhängiger Prädiktor für Mortalität und Rezidivrate diente.⁷⁵

Zur Therapie des Urothelkarzinoms mit Trastuzumab in Analogie zum Mamma- und Magenkarzinom sind bislang nur wenige Studien durchgeführt und publiziert. Diese haben jedoch aufgrund ihrer Beschaffenheit als klinische Phase-1- und 2-Studien nur beschränkte Aussagekraft und erzielten bislang keine eindeutigen Ergebnisse.^{70, 76} Als möglicher Grund kann u.a. die Heterogenität der Her2-Amplifikation und – Expression genannt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der neue beim Mamma-Karzinom genutzte Konjugatwirkstoff Trastuzumab-Emtansin (T-DM1) auch beim Urothelkarzinom Wirkung zeigt.⁷⁷

Um den Her2-Status im Urothelkarzinom genauer zu evaluieren und als Entscheidungsanker im klinischen Alltag nutzen zu können, könnte neben den etablierten Methoden IHC und FISH auch die Analyse der RT-PCR als Detektionsmethode Vorteile bieten. Dabei sind vorrangig ihre Rolle hinsichtlich prognostischer Aussagen sowie auch ihre Validität und ihre Konkordanz zu den anderen Methoden relevant.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Vor dem beschriebenen Hintergrund soll die vorliegende Arbeit Antworten auf zwei Fragestellungen liefern:

1. Wie korreliert die durch eine Reverse Transkriptase RT-PCR gemessene mRNA-Expression von Her2 mit Histopathologie und dem klinischen Outcome der Patienten?
2. Wie ist die dynamische Breite und Sensitivität der RT-PCR?
3. Wie vergleichbar ist eine RT-PCR auf mRNA-Ebene am Beispiel von Her2 im Rahmen eines Interlaborvergleichs?

2 METHODEN UND PATIENTENKOHORTE

2.1 Methoden

2.1.1 Patientenkohorte

In dieser Arbeit wurden retrospektiv erhobene, klinische Daten von 128 Patienten, die zwischen Januar 1998 und November 2009 in der Universitätsmedizin Mannheim einer Zystektomie unterzogen wurden, analysiert. Das histopathologische Staging erfolgte nach der TNM-Klassifikation der International Union against Cancer, das Grading nach der Klassifikation der American Joint Committee on Cancer und der Union for International Cancer Control.^{9, 10} Die Studie wurde durch die Medizinische Ethikkommission II genehmigt (2016-814R-MA). Die Nutzung der Daten wurde gemäß den Richtlinien der Ethikkommission durchgeführt. Das mediane Follow-Up der Patienten lag bei 36,7 Monaten (min.: 0,9 Monate, max.: 179,2 Monate)

Von den 128 Patienten wurde im histopathologischen Befund bei 122 Patienten ein Urothelkarzinom, bei 4 Patienten ein Plattenepithelkarzinom und bei einem Patienten sowohl ein Urothel- als auch Plattenepithelzellkarzinom festgestellt. Das durchschnittliche Alter zum Zystektomieterrmin lag bei 65,97 Jahren (arithmetisches Mittel). 98 Patienten waren männlichen, 30 Patienten weiblichen Geschlechts.

2.1.2 Nomenklatur

Ausgehend von den FFPE-Tumorproben der 128 Patienten wurden drei separate Messreihen angelegt. (Abb. 3)

1. Die Messreihe „Köln Extraktion und PCR“ bestand aus Daten des Labors Stratifyer Molecular Pathology, in Werthmannstraße 1, 50935 Köln, Inh. Dr. Ralph Markus Wirtz. Hierbei wurde aus den 128 FFPE-Blöcken RNA isoliert und davon 86 Proben mittels SuperScript III PLATINUM One-Step amplifiziert. (s. S. 21f) Die Daten lagen als Rohdaten vor und beinhalteten relative Ct-Werte der im dortigen Labor durchgeführten RT-PCR.
2. Daten der Messreihe „Mannheim PCR“ wurden im Mannheimer Labor aus den 128 RNA-Proben gewonnen, die zuvor im Kölner Labor extrahiert worden waren. (s. S. 18 ff) Zum Vergleich mit der Messreihe „Köln Extraktion und PCR“ lagen damit 86 überschneidende Wertepaare vor.

3. Für die Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“ wurden Extraktion, cDNA-Synthese und RT-PCR anhand von 20 Resektaten ausschließlich im Mannheimer Labor durchgeführt. Die 20 Proben speisten sich aus dem Pool der 128 in den anderen Messreihen genutzten FFPE-Blöcke. (s. S. 16)

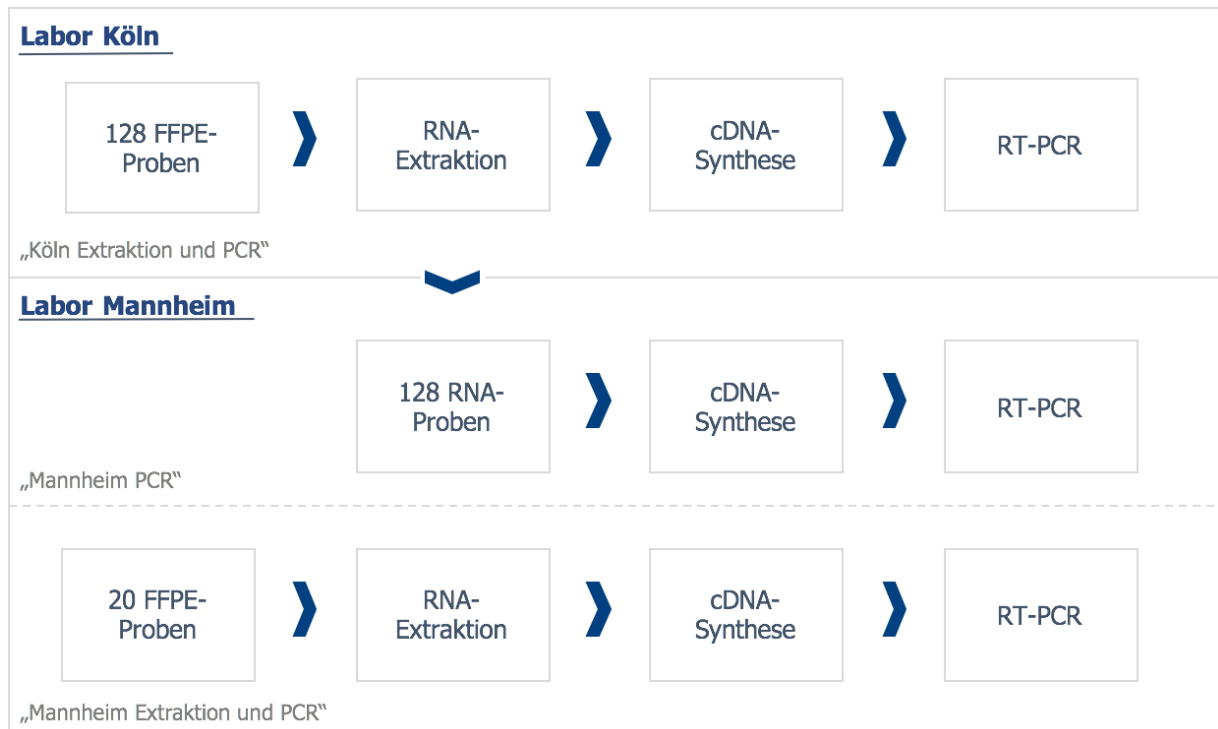


Abbildung 3: Struktur und Nomenklatur der in dieser Arbeit gebildeten Messreihen

2.1.3 Zellkultur

Die Arbeit mit den Zellkulturen entsprach den Vorschriften für sicheres mikrobiologisches Arbeiten. Zellen der Zelllinie RT112 und UM-UC 3 wurden kultiviert in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Zellen der Zelllinien T24 und RT4 in McCoy 5a Medium sowie Zellen der Urotsa-Zelllinie mit Rosswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), jeweils versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum und 2mM Glutamin in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5 %iger CO₂-Begasung. Die Arbeit erfolgte steril unter einer Zellkultur-Werkbank. Kulturmedien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt und alle 2-3 Tage erneuert. Hierzu wurde das alte Medium abgenommen, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) unter Schwenken der Flasche gewaschen und mit 10-15ml neuem Medium versehen.

Bei Anwachsen auf bis zu 70-80% des Flaschenbodens wurden die Zellen passagiert. Hierbei wurden die Zellen zunächst nach Absaugen des alten Mediums mit 2-3 ml Trypsin unter Schwenken der Flasche vom Flaschenboden gelöst. Nach Beendigung der Trypsinreaktion durch Zugabe serumhaltigen Mediums wurde eine Aliquot Zellsuspension in eine neue Flasche überführt und mit 10-15 ml neuem Medium versehen.

2.1.4 RNA-Extraktion aus Zelllysaten

Die RNA-Isolation aus Zelllysaten erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, NL). Dabei wurden die Zellen zunächst nach Abnehmen des Mediums mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und unter Zugabe von 5ml Trypsin gelöst. Nach Inaktivierung der Trypsinreaktion durch serumhaltiges Medium wurden die Zellen bei 400 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 350 µl RLT-Puffer versetzt, zu dem zuvor Beta-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 hinzugegeben worden war, und dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß versetzt. Das Lysat wurde daraufhin durch zehnfaches Hindurchziehen durch eine 20 G Nadel homogenisiert und mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt. Nach Durchmischen wurden 700 µl der Lösung auf eine RNeasy Säule appliziert, welche sich in einem 2 ml Tube befand, und für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, der Rest der Suspension auf die Säule gegeben, zentrifugiert und abermals der Überstand verworfen. Ebenso wurden zunächst 600 µl RW1-Puffer und dann 500 µl RPE-Puffer auf die Säule appliziert, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurde die Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl RPE-Puffer versehen und für 3 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach Platzierung der Säule in ein 2 ml Sammelgefäß wurden 30 µl 65 °C heißes RNase freies Wasser auf die Säulenmembran gegeben. Nach 1 min wurde das Gefäß für 3 min bei 13000 U/min zentrifugiert und das Eluat in einen RNase freies 1,5 ml Gefäß überführt. Abschließend konnte die RNA-Konzentration photometrisch mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt werden. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.1.5 RNA-Extraktion aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben

Für die Extraktion wurden 20 Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeproben von Urothelkarzinomen der Tumorstadien T2 bis T4 ausgewählt, Zystektomiedatum 1998 bis 2006.

Die RNA-Extraktion aus FFPE-Gewebeproben erfolgte mittels XTRAKT-FFPE-Kit (Stratifyer Molecular Pathology, Köln). Zur Auflösung des Paraffins wurden 150 µl Lysepuffer hinzugefügt und der Ansatz im Thermomixer für 30 min bei 80°C und 1200 U/min inkubiert. Um im entstandenen Lysat Nukleinsäuren zu isolieren, wurden 50 µl Proteinase K hinzugefügt und der Ansatz anschließend 30 min bei 65°C und 1200 U/min inkubiert.

Zur Isolation der RNA aus dem Lysat wurde der Ansatz zunächst mit 800 µl MagiX RNA-Puffer vermischt. Die Isolation erfolgte mittels magnetischer MagiX-Beads, welche die RNA binden und durch Magnetisierung an der Wand des Reaktionsgefäßes fixieren, während der Überstand entfernt werden kann. Hierzu wurden die Lösung mit 40 µl des MagiX-Bead RNA-Konzentrat versehen und nach intensivem Durchmischen und 15-minütiger Inkubation bei 1200 U/min magnetisiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zur Aufreinigung der RNA-tragenden Beads wurde zunächst 850 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffer 1 hinzugegeben, das Reaktionsgefäß mehrfach in der Luft und dann im magnetisierenden Gefäßständer gewendet und der Überstand verworfen. Dieser Schritt erfolgte ebenso mit Waschpuffer Nr. 2 und Nr. 3. Die Ablösung der RNA von den Beads erfolgte durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer und Inkubation (15 min, 70 °C, 1200 U/min). Nach anschließender Magnetisierung konnte die aufgereinigte Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert werden. Im Anschluss an die Extraktion wurde die Konzentration der RNA mittels NanoDrop ND-1000 gemessen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20 °C.

2.1.6 Klonierung externer Standards für die RT-PCR

Die Klonierung Her2-inkludierender Plasmide für die Herstellung von Standard-Verdünnungsreihen erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit for Sequencing und dem One Shot Top 10 Kit (beides Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Anleitung. Für die Transformation wurden die im One Shot Top 10 Kit enthaltenen biochemisch kompetenten E.Coli-Stämme verwendet.

Für die Transformation wurde zunächst ein Reaktionsmix aus 2 μl des zu klonierenden Her2-Amplifikats (gewonnen aus Zelllysaten), 1 μl Salzlösung, 2 μl ultrareines Wasser und 1 μl des Vektors hergestellt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation von E.Coli-Zellen erfolgte unter Zugabe von 2 μl der Reaktionsmische. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde der Transformationsansatz für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und umgehend wieder auf Eis gesetzt. Der Ansatz wurde mit 250 μl SOC-Medium versehen und für 45 min bei 37°C mit 220 U/min inkubiert. Im Anschluss wurden je 150 μl auf vorgewärmte Agarplatten ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für die Isolation transformierter Bakterienkulturen wurde eine Minipräparation mit einem QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Venlo, NL) durchgeführt. Hierzu wurden Einzelkolonien in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt, die mit LB-Medium versehen waren, und für 14 Stunden bei 37°C im Schüttler bei 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 3 min bei 18°C mit 8000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von je 250 μl P1- und P2-Puffer und 350 μl N3-Puffer mit jeweils anschließendem vorsichtigem Durchmischen durch mehrfaches Wenden des Gefäßes. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 U/min wurde ein Pellet aus bodenständigen Zellen geformt. Der nukleinsäurehaltige Überstand wurde auf eine stark kationenhaltige Säule gegeben und mehrfach mit Waschpuffer und anschließender Zentrifugation aufgereinigt. Die finale Elution der Ziel-Plasmide aus der Säule erfolgte mit 50 μl Elutionspuffer und erneuter Zentrifugation in ein Reaktionsgefäß. Die Plasmidkonzentration im Eluat wurde mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt. Zur Sequenzierung der Plasmide wurde die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) beauftragt.

Die Herstellung der für die PCR verwendbaren Standard-Verdünnungsreihen erfolgte durch Hinzugabe von Aqua bidest zu den Zielplasmiden Verdünnungen der Größenordnungen 2×10^1 bis 2×10^6 Plasmide pro μl . Diese wurden in TaqMan Fast Universal Master Mix PCR Testläufen (s. PCR) auf ihre Sensitivität getestet.

2.1.7 cDNA-Synthese

Es erfolgte abhängig von der RNA-Extraktions-Methode (Zelllysate vs. FFPE-Proben) eine Umschreibung der RNA in cDNA mittels MMLV und Random Hexamer Primern aus Zelllysaten und mittels Sequenzspezifischen Primern und Superscript III aus FFPE Proben.

cDNA-Synthese aus den RNA-Proben der Zelllinien:

Schlüsselenzym dieser cDNA-Synthese bildete eine aus dem Moloney Murine Leukemia Virus isolierte Reverse Transkriptase (M-MLV RT). Für den Reaktionsmix wurden zunächst 5 µg der Ziel-RNA in 20 µl Aqua bidest eluiert. Die Lösung wurde für 10 min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Mit einem Gesamtvolumen von weiteren 20 µl wurde die Lösung mit 2 µl Random Hexamer Primer, 2µl 10mM dNTP Mix, 8 µl 5-fach M-MLV Puffer, 4 µl 0,1 M Dithiotreitol, 2 µl RNaseOUT und 2 µl M-MLV RT auf 40 µl ergänzt. Abschließend wurde der resultierende Ansatz zunächst für 120 min bei 37°C und dann für 5 min bei 65°C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

cDNA-Synthese aus FFPE-extrahierter RNA:

Sowohl die cDNA-Synthese aus den 20 eigenhändig gewonnenen RNA-Proben als auch die aus den 128 bereitgestellten RNA-Proben erfolgte mit sequenzspezifischen Her2-Primern sowie der Reversen Transkriptase Superscript III. Für den Reaktionsansatz wurden zunächst 7,5 µl der Ziel-RNA mit je 0,5 µl (10pmol/µl) eines sequenzspezifischen Primers und 1,5 µl 10mM dNTP Mix vermischt und mit Aqua bidest auf 18 µl eluiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 65°C im Heizblock inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurden jeweils 4 µl 5 x First Strand Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT und 2 µl Superscript III (200U/µl) hinzugegeben. Abschließend wurde der Ansatz für 120 min bei 55°C und dann für 15 min auf 70°C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C

2.1.8 Real-Time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

2.1.8.1 PCR-Durchführung Mannheim

Die durchgeführte Real-Time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) erfolgte sowohl mit den 20 eigenhändig gewonnenen RNA-Isolaten als auch mit den 128 parallelen RNA-Proben des Referenzlabors Stratisfyer Molecular Pathology GmbH in Köln, die dort aus Urothelkarzinom-FFPE-Gewebeproben gewonnen worden waren.

Die Amplifikation definierter cDNA-Fragmente erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR über ein Step One Real-Time PCR System (Thermo Fisher). Die Expressionswerte der Zielgene wurden auf die beiden endogenen Haushaltsgene (in dieser Arbeit syn. mit Referenz- od. Kontrollgene) Calmodulin (Calm) und β -Glucoronidase (Gus) normalisiert. Die Berechnung der normalisierten Expressionswerte erfolgte mittels relativer Quantifizierung über die $40-\Delta\text{CT}$ -Methode nach Czechowski et al.⁷⁸ Dabei wird der Differenzwert von Ziel- und Haushaltsgen von einem arbiträren Ct-Wert abgezogen, welcher sich an der Zykluszahl der PCR orientiert:

$$40-\Delta\text{CT} = 40 - (\text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Haushaltsgen}})$$

Bei der Interpretation der Daten mit dieser Formel ist zu beachten, dass die entstehenden Werte im Gegensatz zu unveränderten Ct-Werten proportional zur Menge amplifizierten Her2-DNA sind. Ein hoher Wert ist gekennzeichnet durch eine hohe Her2-Expression im Verhältnis zur Expression des Referenzgens.

Außerdem erfolgte eine absolute Quantifizierung gegen das klonierte Standardplasmid. Dabei wird das Fluoreszenzsignal der amplifizierten Stränge mit dem Signal des Standards einer definierten Konzentration abgeglichen. Daraus resultiert die absolute Anzahl der amplifizierten DNA-Kopien des Zielgens.⁷⁹

Die Reproduzierbarkeit wurde einerseits durch Dreifachbestimmung der einzelnen Ziel-DNA-Proben innerhalb eines Laufs sichergestellt, andererseits durch die Mitbestimmung von cDNA-Proben der Zelllinien T24 und RT112 über die gesamte Versuchsreihe. Zur Ermittlung der Intra-Assay-Variabilität wurden cDNA-Proben der Zelllinie T24 in 13-fach Ansätzen mit dem Farbstoff SYBR Green als Sondenersatz sowie cDNA der Zelllinie RT112 als 6-fach Ansatz mit der in den Zielversuchen einge-

setzten Sonde bestimmt und über die Standardkurven quantifiziert. Diese Quantifizierung fand sowohl für das Zielgen Her2, als auch für das Haushaltsgen Calmodulin statt. Zur Berechnung des entsprechenden Variabilitätskoeffizienten (CV, Coefficient of Variation) kam folgende Formel zum Einsatz:

$$CV = \text{Standardabweichung} / \text{arithmetischer Mittelwert} \times 100$$

Zur Bestimmung der Inter-Assay Variabilität wurde bei jeder RT-PCR eine Duplikatmessung mit cDNA-Proben der Zelllinie T24 mitbestimmt. Die Variabilität berechnete sich durch den Mittelwert und die Standardabweichung über alle Doppelmessungen. Die Amplifikationseffizienz (E) wurde berechnet aus der Steigung (m) der Regressionsgeraden der Standardverdünnungsreihen mit der Formel:

$$E = 10^{-1/m}$$

Eine optimale Amplifikationseffizienz entspricht der Verdopplung der DNA in jedem PCR-Zyklus und liegt damit bei $E = 2$.

Für die Durchführung der PCR kamen TaqMan Assays von Thermo Fisher zum Einsatz. Die Master Mixe der Assays enthalten eine modifizierte Taq-Polymerase, dNTPs, 10 x Puffer sowie 10 mM MgCl₂. Als Signalmolekül fungierte eine Fluoreszenzsonde, welche einen VIC oder einen 6-Carboxyfluorescein(FAM)-Farbstoff trägt (s. Einleitung). Für die Amplifikation spezifischer DNA-Zielfragmente wurden für die Zielgene spezifische Primer genutzt. (s. Tab. 13: Oligonukleotide) Als Reaktionsträger kamen 96-Well Platten zum Einsatz, die Reaktion fand in einem Volumen von 20 µl statt. Während des Pipettierens wurde die 96-Well Platte in einen Kühlblock gestellt. Im Anschluss an das Pipettieren wurde die Platte mit einer Abdeckfolie versehen und bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert. Die zu analysierenden Proben wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und sowohl Positivkontrollen mit cDNA der Zelllinien T24 und RT112 als auch Negativkontrollen mitbestimmt. Zur Normalisierung der Her2-Expression wurden die Haushaltsgene Calmodulin 2 und β-Glucuronidase mitbestimmt. Die absolute Quantifizierung wurde durch die zuvor geklonten Her2-inkludierenden Plasmidverdünnungsreihen ermöglicht sowie durch laboreigene Verdünnungsreihen der eingesetzten Haushaltsgene.

Tabelle 4: Reaktionsansatz PCR mit den 128 bereitgestellten Proben (Mannheim PCR)

Reagenz	Volumen
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	10 µl
Forward Primer	0,75 µl, 300nM
Reverse Primer	0,75 µl, 300nM
Sonde	0,5 µl, 200nM
DNA-Probe	2 µl
Nukleasefreies Wasser	auf 20 µl

PCR-Protokoll für die 128 bereitgestellten Proben:

95°C für 20 Sekunden

45 Zyklen mit je:

95°C für 1 Sekunde

60°C für 20 Sekunden

Tabelle 5: Reaktionsansatz PCR mit den 20 eigenhändig gewonnenen Proben (Mannheim Extraktion und PCR)

Reagenz	Volumen
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	5 µl
Forward Primer	0,375 µl, 300nM
Reverse Primer	0,375 µl, 300nM
Sonde	0,25 µl, 200nM
DNA-Probe	3 µl
Nukleasefreies Wasser	auf 10 µl

PCR-Protokoll für die 20 eigenhändig gewonnenen Proben:

95°C für 20 Sekunden

40 Zyklen mit je:

95°C für 3 Sekunden

60°C für 30 Sekunden

2.1.8.2 PCR-Durchführung Labor Köln

Die im Kölner Labor durchgeführte PCR wurde in Duplikaten mittels des SuperScript III PLATINUM One-Step quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) auf einem Stratagene Mx3005p (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) durchgeführt.⁸⁰

PCR-Protokoll der Messung des Kölner Labors:

50° C für 30 Minuten

95° C für 2 Minuten

40 Zyklen mit je:

95° C für 15 Sekunden

60° C für 30 Sekunden

Die Normalisierung erfolgte wie im Mannheimer Labor im Verhältnis zur Expression des Kontrollgens Calmodulin 2 (ΔCt) und wurde als $40-\Delta\text{Ct}$, welche mit der mRNA-Expression des Zielgens korreliert, angegeben.

2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Im Optimierungsprozess der RT-PCR und zum Nachweis von cDNA-Syntheseprodukten kam die Agarose-Gelelektrophorese zum Einsatz, welche Nukleinsäuren durch Anlegen einer Spannung anhand ihrer Ladung und Größe auftrennt. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden 2 %ige Agarosegele genutzt. Die Herstellung begann mit der Auflösung von 0,8 g Agarose in 40ml 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) unter Sidehitze in der Mikrowelle gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Es wurde ein Probenkamm eingesetzt, der nach Polymerisierung des Gels wieder entfernt wurde. Im Anschluss wurde das Gel mit 1 x TEA-Puffer übergossen.

Um die Ziel-DNA nach der Elektrophorese im UV-Licht sichtbar zu machen, wurden vor der Probenbeladung auf einer Parafilmfolie jeweils 10 μl der DNA-Proben mit 2 μl Midori Green Färbelösung vermischt, welche dann in die Geldaschen geladen werden konnten. Die beiden Taschen an den Rändern des Gels wurden für die Größenbestimmung der DNA-Proben mit je 10 μl Markern der Größe 1 kbp und 100 bp beladen. Für die Elektrophorese wurde für etwa 30 min eine Spannung von ca. 110 V angelegt. Anschließend konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.2 Statistik

Die Statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism Version 5.0 (La Jolla, CA, USA).

Zur Erfassung von Häufigkeiten wurden Verfahren der deskriptiven Statistik angewandt. Um unterschiedliche Expressionsniveaus des Her2-Gens mit der Überlebenszeit der Patienten zu korrelieren, wurden Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier durchgeführt. Dabei wurde das krankheitsspezifischen Überleben (DSS – Disease Specific Survival) definiert als Zeit zwischen der Erstdiagnose bis zum nachgewiesenen Rezidiv der Erkrankung, bzw. Tod. Die Vergleichsgruppen wurden mit dem Log-Rank-Test auf signifikante Unterschiede verglichen.

Um die Unterschiede der PCR-Ergebnisse zwischen den einzelnen Messreihen zu untersuchen, kam zunächst der Spearman-Korrelationskoeffizient zum Einsatz. Dieser misst den linearen Zusammenhang zwischen zwei annähernd normalverteilten Variablen. Zur weiteren Darstellung wurden Bland-Altman-Diagramme erstellt, die den Zusammenhang zwischen den Differenzen zwischen gepaarten Werten und deren Mittelwert illustrieren.

Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkohorte

Von den 128 Patienten der Kohorte konnte bei 45 Patienten intraoperativ keine lymphovaskuläre Infiltration nachgewiesen werden, während bei 64 Patienten eine eindeutige intraoperative Infiltration und bei 19 Patienten nur in der histopathologischen Untersuchung eine Infiltration gezeigt werden konnte. Bei 112 Patienten verblieb der postoperative Resektionsrand ohne Tumorrest (R0), während 12 Patienten mikroskopische Tumorreste und 4 Patienten einen unklaren Resektionsstatus aufwiesen. Ein Patient erhielt eine neoadjuvante Chemotherapie während 15 Patienten eine adjuvante Chemotherapie erhielten. Keiner der Patienten wurde im Therapieverlauf bestrahlt. (Tab. 6)

Tabelle 6: Klinische und histopathologische Charakteristik der untersuchten Patientenkohorte

Pat. Kohorte	abs. Anzahl	rel. (%)
Insg.	128	100
Urothel-Ca.	122	95,3
Plattenepithel-Ca.	4	3,1
Urothel-Ca.+Plattenepithel-Ca.	1	0,78
Todesursache		
Urothel-Ca.	47	36,7
andere Urs.	19	14,8
Unbekannt	26	20,3
Perioperativ	2	1,6
Age at Cx		
Minimum	39	
25% Percentile	59,25	
Median	66	
75% Percentile	73,75	
Maximum	93	
Geschlecht		
Männlich	98	76,6
Weiblich	30	23,4
Staging bei Cx		
pT1	2	1,6
pT2	37	28,9

pT3	62	48,4
pT4	23	18
pTa	3	2,3
Cis	1	1,6
Lymphovaskuläre Infiltration		
keine Infiltration	45	35,1
Infiltration nachgewiesen	64	50
Im Histologiebericht	19	14,8
Resektionsrand		
R0	112	87,5
R1	12	9,4
R2	0	0
R3	4	3,1
Therapie		
Cx	128	100
neoadj. CT	1	1,6
neoadj. RT	0	0
adj. CT	15	11,7
adj. RT	0	0

3.2 Optimierung RT-PCR

Zur Optimierung der RT-PCR wurde diese anhand von cDNA der fünf Urothelzelllinien Urotsa, UMUC, T24, RT112 und RT4 mit verschiedenen Primerkombinationen für das Her2-Gen durchgeführt. In allen Zelllinien zeigte die Kombination He2_26For und Her2_27Rev eine deutliche Bande. Aus diesem Grund wurde diese Kombination für die Her2-PCR Messungen mit Patientenproben festgelegt.

Diverse Versuche mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen und Magnesiumkonzentrationen ergaben, dass eine Annealingtemperatur von 60°C und eine Extensionszeit von 20-30 Sekunden das beste Ergebnis zeigt.

Da in früheren Studien im Mammakarzinom für Calmodulin 2 eine ausgeprägte Stabilität und gleichmäßigen Expression unabhängig vom Alter der Testperson gezeigt werden konnte, wurde Calmodulin 2 für diese Studie als Haushaltsgen ausgewählt.⁸¹

3.2.1 Klonierung geeigneter Standards

Zur Auswahl einer geeigneten Primerkombination für die Klonierung von Standards für Her2 und für das Haushaltsgen Calmodulin wurden qualitative RT-PCRs mit gepoolter cDNA diverser Urothelkarzinom-Zelllinien anhand verschiedener Primerkombinationen durchgeführt. Damit die Standards in nachfolgenden Versuchen für ein möglichst breites Spektrum an Her2-Zielabschnitten genutzt werden konnten, wurde die Primerkombination mit dem größten Klonierungsprodukt 18f und 30r2 für die Klonierung ausgewählt. Die Primer MP501f und MP501r wurden gleichermaßen für die Klonierung von Calmodulin ausgewählt.

Die erfolgreiche Amplifikation der Calm- und Her2-tragenden linearisierten Plasmide konnte im Anschluss an die Klonierungsreaktion anhand einer qualitativen PCR im Agarosegel nachgewiesen werden. Abb. 4 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese mit den linearisierten Plasmiden, die bei der Klonierung synthetisiert wurden. Es sind sowohl für Calm als auch für Her2 eindeutige Banden erkennbar.

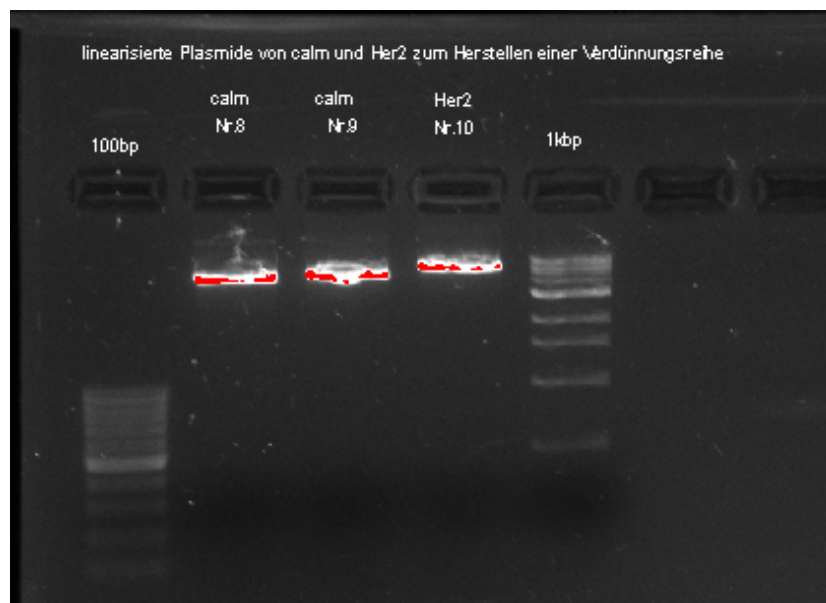


Abbildung 4: Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR der Klonierungsprodukte. Sowohl für Calm, als auch für Her2 ist eine eindeutige Band bei ca. 1kbp bzw. 900 bp sichtbar.

Auch die im Anschluss durchgeführte Sequenzierung der Klonierungsprodukte zeigte eine 99-prozentige Übereinstimmung mit dem Her2-Gen. Eine durch ein BLAST-Programm (Basic Local Alignment Search Tool) des National Center for Biotechnology Information durchgeführte Suche nach Übereinstimmung des sequenzierten Klo-

nierungsprodukts mit einer Variante des Her2-Gens ergab eine Übereinstimmung von 963 von 964 Basen.

Die Sequenzierung des Klonierungsprodukts von Calmodulin ergab ebenfalls eine 100-prozentige Übereinstimmung mit dem Calmodulin 2-Gen.

3.2.2 Standard-Performance

Nach Zugabe von Aqua bidest zur Herstellung von Verdünnungen der Größenordnungen 2×10^1 bis 2×10^6 Plasmide pro μl wurden diese durch eine quantitative TaqMan-PCR validiert.

Das Amplifikationsdiagramm in Abb. 5 zeigt symmetrisch gestaffelte Signalanstiege des Her2-Amplifikats bei nahezu linearen Standardkurven mit einem Regressionskoeffizienten von 0,999 (Abb. 6), was auf eine exakte Verdünnung der Klonierungsprodukte schließen lässt. Insgesamt zeigt sich eine sehr genaue und zuverlässige Quantifizierung sowie durchgehende Linearität über den Zielbereich von sechs Zehnerpotenzen. Die Amplifikationsergebnisse der Calm-Proben waren vergleichbar präzise.

Die in dieser Klonierung entstandene DNA wurde damit als Standard in den PCR-Läufen mit den Patientenproben eingesetzt.

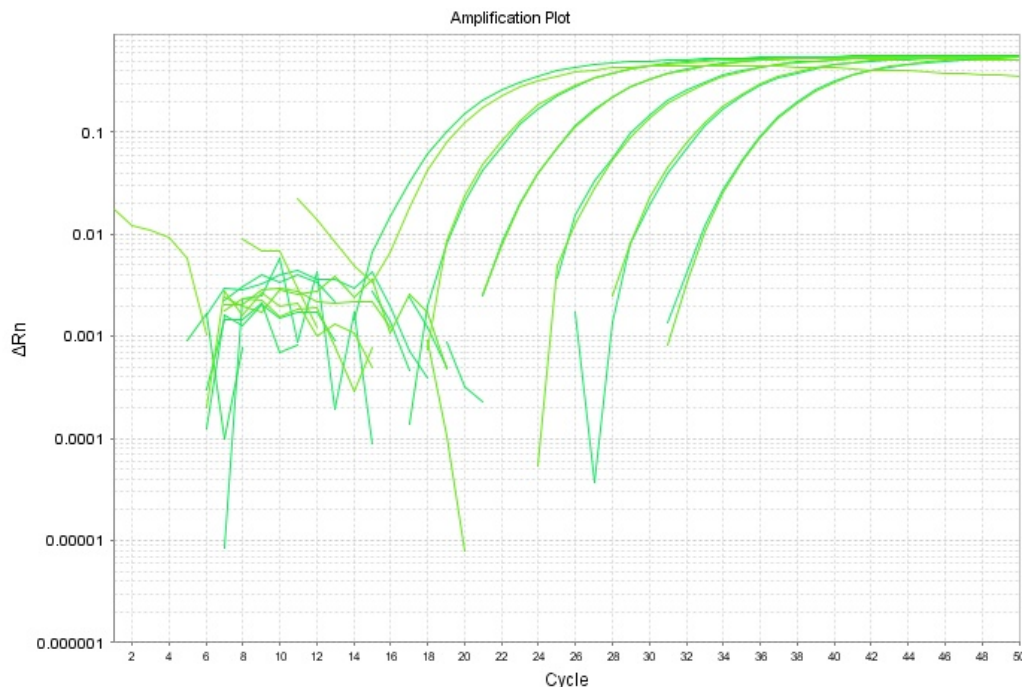


Abbildung 5: Amplifikationsdiagramm der Standard-Verdünnungsreihe des Her2-Gens. Zielkonzentration: 2×10^1 bis 2×10^6 Plasmide pro μl . Amplifikation in allen Ansätzen erkennbar. Jeder Ansatz wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

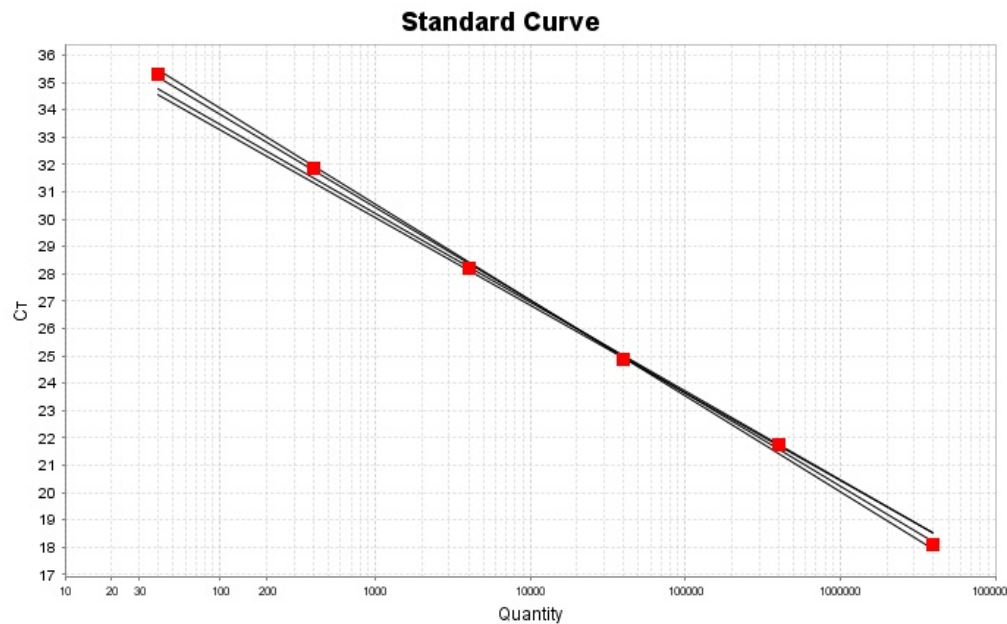


Abbildung 6: Standardkurvendiagramm der Verdünnung des Her2-Standards. Ct-Werte sind aufgetragen gegen die Konzentration des Plasmids. Regressionskoeffizient $R^2 = 0,999$. Die Ansätze wurden jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die über die Steigungen der Standardkurven berechneten Amplifikationseffizienzen lagen für Her2 bei $E = 1,97$ und für Calm bei $E = 2,01$.

3.2.3 Inter- und Intra-Assay-Variabilität

Die Intra-Assay-Variabilität der PCR-Amplifikation lag bei den 13-fach SYBR-Green-Messungen für die Zelllinie T24 bei 0,563% für Her2 und bei 0,362% für Calmodulin. In den Messungen mit den Sonden für Her2 (Her2_27P) und Calmodulin (MP_501P) lag die Intra-Assay-Variabilität für die Zelllinie RT112 bei 0,523% für Her2 und bei 0,058% für Calmodulin. (Tab. 7)

Tabelle 7: Intra-Assay-Variabilität illustriert anhand von Ct-Werten der Zelllinie RT112. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der durchgeführten Doppelbestimmungen

RT112		
Probenr.	Her2	Calm
1	28,79	25,24
2	28,52	25,25
3	28,61	25,24
4	28,82	25,22
5	28,86	25,25
6	28,90	25,21
MW	28,75	25,24
SD	0,15	0,01

Variabilitätskoeffizient	0,5297%	0,0585%
---------------------------------	----------------	----------------

Der Inter-Assay-Variabilitätskoeffizient betrug bei den parallel mitbestimmten cDNA-Proben der Zelllinie T24 für Her2 2,615% und für Calmodulin 1,43% und lag damit etwas höher als die Intra-Assay-Variabilität. (Tab. 8)

Tabelle 8: Inter-Assay-Variabilität illustriert anhand von Ct-Werten der Zelllinie T24. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der durchgeführten Doppelbestimmungen

T24		
Lauf	Her2	Calm
1	27,67	25,26
2	27,75	25,44
3	27,84	25,48
4	28,06	26,11
5	28,08	25,81
6	28,15	26,08
7	28,21	26,06
8	28,27	25,86
9	28,59	25,82
10	28,59	25,97
11	28,80	25,16
12	28,84	26,04
13	28,89	25,57
14	29,20	25,55
15	29,44	26,53
16	29,47	26,00
17	30,54	26,28
MW	28,61	25,82
SD	0,74815675	0,36924784
Variabilitätskoeffizient	2,61%	1,43%

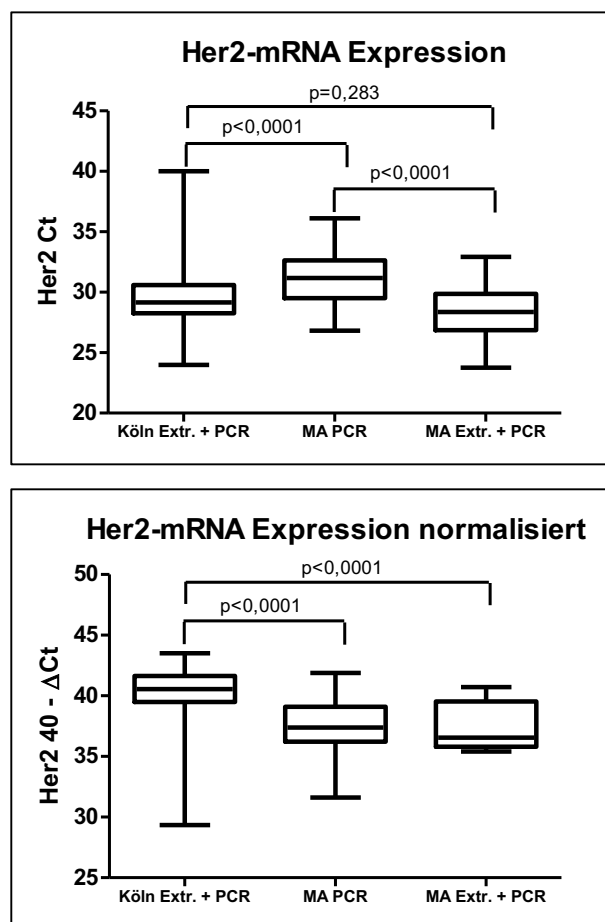
Zusammengefasst zeigen die Amplifikationseffizienzen und Variabilitätskoeffizienten, dass die etablierte PCR über einen breiten dynamischen Bereich von 6 Logstufen eine hohe Sensitivität aufweist.

3.3 Ergebnisse der RT-PCR

3.3.1 Deskriptiv

Die mediane normalisierte mRNA-Expression war über alle Messreihen vergleichbar. Die medianen Ct-Werte waren vor Normalisierung deutlich geringer als nach Normalisierung. Während sich bei den nicht-normalisierten Ct-Werten alle Mediane signifi-

kant unterschieden, konnte durch die Normalisierung zwischen den beiden Mannheimer Messreihen eine Angleichung der Mediane erreicht werden. (Abb. 7) In nicht-normalisierter Form lag die höchste mediane relative Expression und damit der niedrigste mediane Ct-Wert mit 28,36 (SD = 2,3; 95%-KI: 27,10; 29,27) in der Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“ vor. Nach Normalisierung zeigte diese Messreihe die niedrigste Expression mit einem medianen Ct-Wert von 36,56 (SD = 1,8; 95%-KI: 36,52; 38,28). Die Messreihe des Kölner Labors „Köln Expression und PCR“ zeigte sowohl vor als auch nach Normalisierung eine hohe mediane relative Expression im Vergleich zu den anderen beiden Messreihen. Gleichzeitig zeigte sie die breiteste Streuung der Werte mit einer Standardabweichung von 2,7 (nicht-normalisiert) bzw. 2,5 (normalisiert). Nach Integration des Standards konnte bei Bestimmung der absoluten Kopienanzahlen kein signifikanter Unterschied zwischen den Mannheimer Messreihen festgestellt werden.



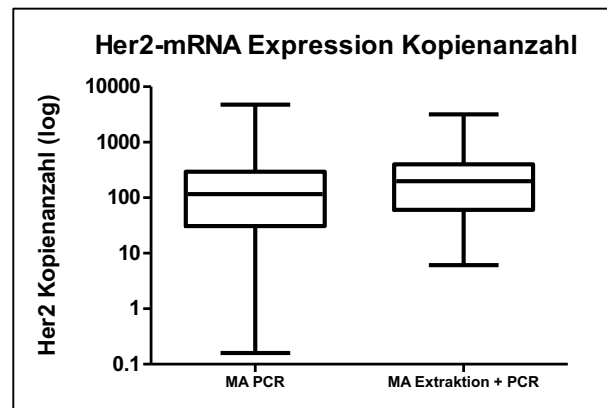


Abbildung 7: Verteilung der Her2-Expression in den analysierten Messreihen als nicht-normalisierte (oben), normalisierte (mitte) und Absolutwerte (unten). Während die relativen Expressionswerte (oben und mitte) signifikante Unterschiede aufweisen, ist die absolute Kopienanzahl (unten) der beiden Messreihen „Mannheim PCR“ und „Mannheim Extraktion und PCR“ vergleichbar.

3.3.2 Nach klinischen Eigenschaften der Patienten

3.3.2.1 Messreihe „Mannheim PCR“

Die normalisierte Genexpression der Patientenproben wurde hinsichtlich des Geschlechts, des Tumor-Status (pT), des Tumor-Grades (G), der lymphovaskulären Invasion (LVI), des Lymphknotenstatus (N), des Metastasierungsstatus (M) mittels Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben auf signifikante Unterschiede getestet. Um Unterschiede in der Genexpression zwischen verschiedenen Altersgruppen festzustellen, wurde die Patientenpopulation zunächst in zwei Altersgruppen, größer und kleiner als der Median von 66 Jahren, geteilt. Im Anschluss wurden die jüngsten und die ältesten 10% der Patienten miteinander verglichen. Patienten mit G1-Tumoren sowie Patienten mit positivem Resektionsrand (R1) kamen aufgrund zu geringer Anzahl in der Population nicht zur Darstellung.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression abhängig von den genannten Parametern festgestellt werden. (Abb. 8) Beim Vergleich von T3- zu T4-Tumoren konnte ein nahe signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,069$ nachgewiesen werden.

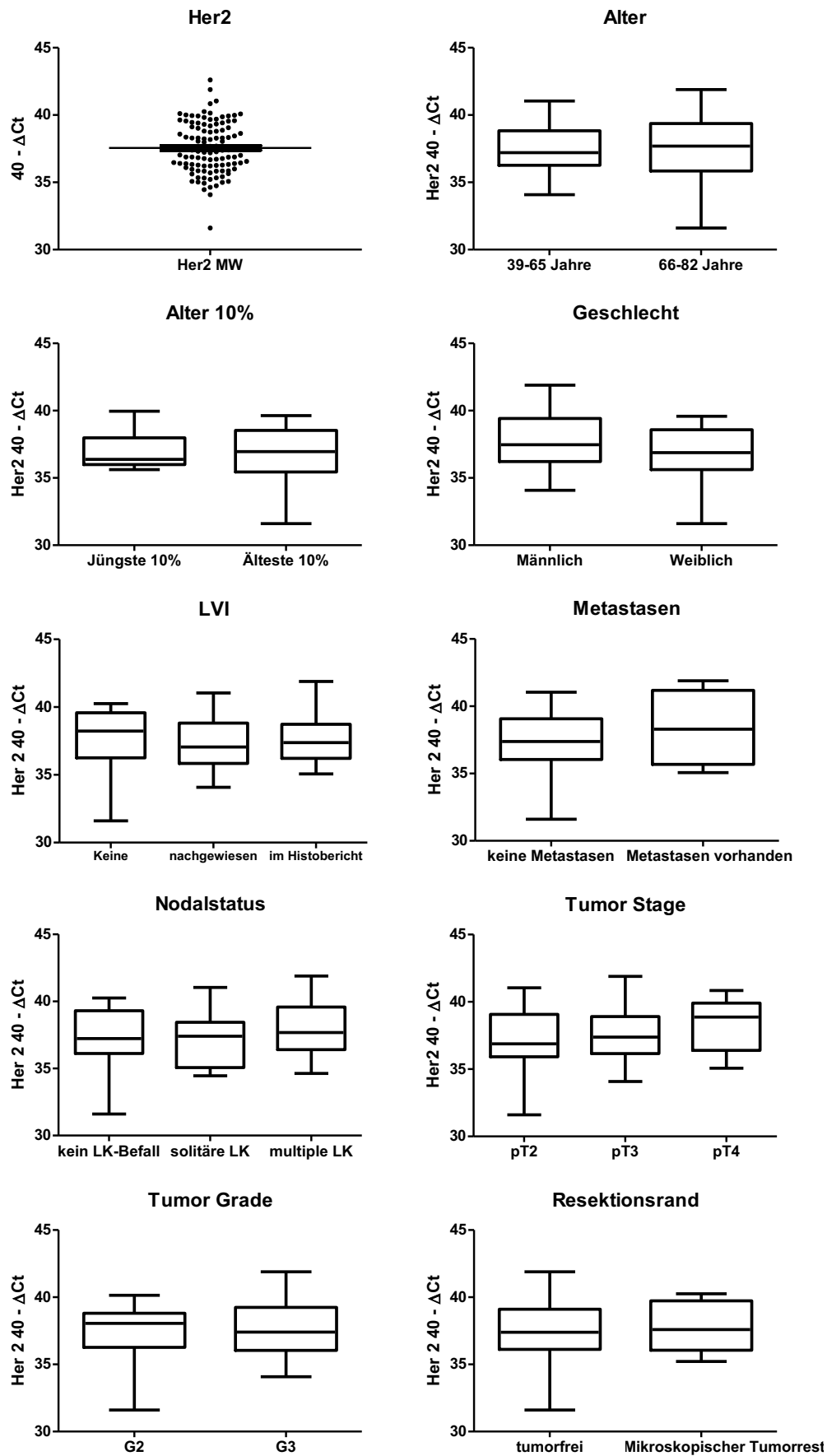
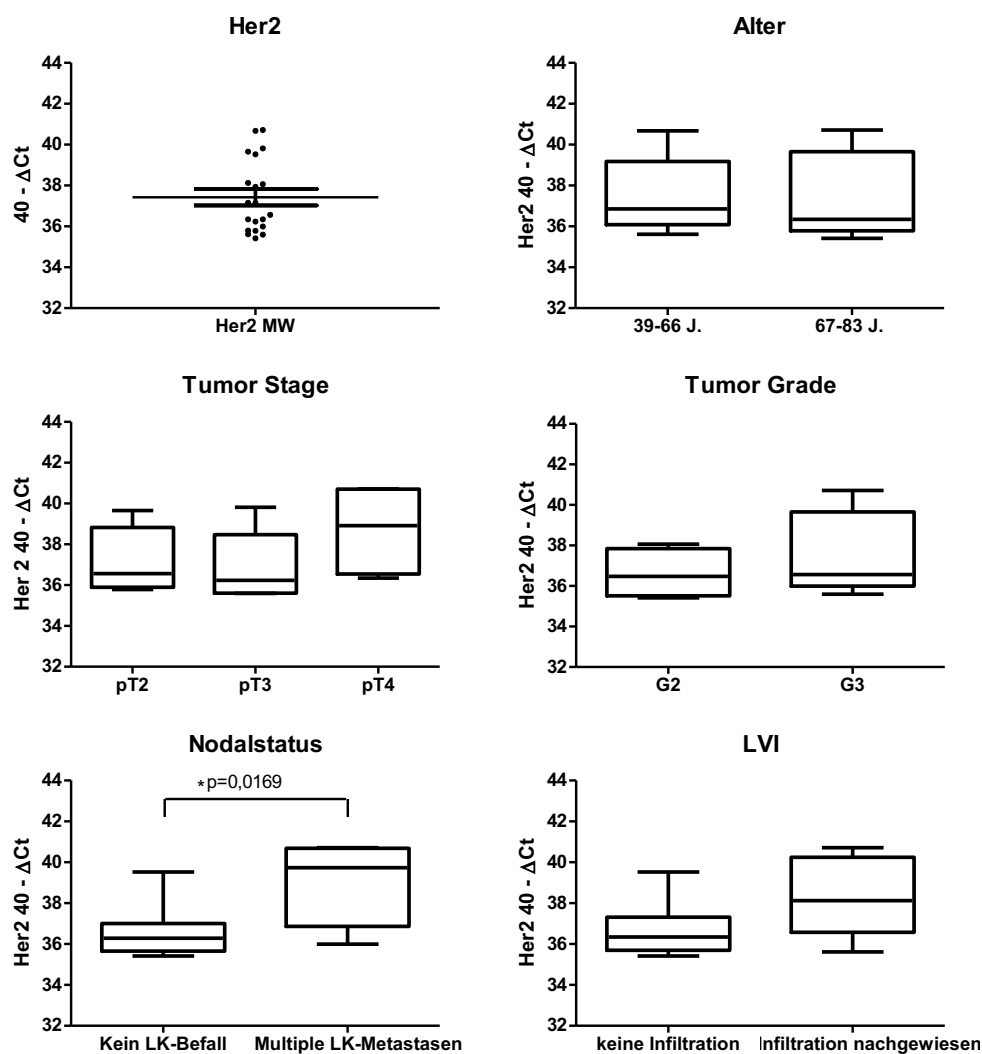


Abbildung 8: Korrelation der normalisierten Her2-Genexpression der Messreihe „Mannheim PCR“ mit klinischen und histopathologischen Parametern der analysierten Patienten. Es zeigt sich bei keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied der Her2-Expression.

3.3.2.2 Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“

Die normalisierte Genexpression der Patientenproben wurde hinsichtlich des Alters, des Tumor-Status, des Tumor-Grades, der lymphovaskulären Invasion, des Lymphknotenstatus und des Metastasierungsstatus mittels Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben auf signifikante Unterschiede getestet.

Es konnte für den Lymphknotenstatus ein signifikanter Unterschied in der Genexpression festgestellt werden. (Abb. 9) Dabei zeigte sich in der Stichprobe ohne LK-Befall ein kleinerer Ct-Median (Ct = 36,92) als in der Stichprobe mit multiplen LK-Metastasen (Ct = 39,73). ($p = 0,0169$) (Abb. 9)



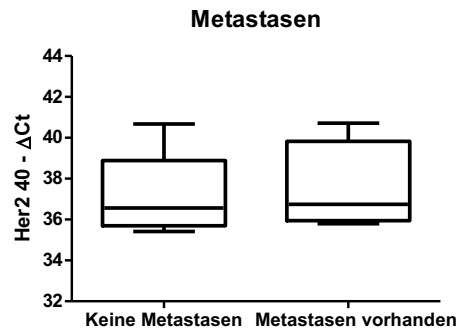


Abbildung 9: Korrelation der normalisierten Her2-Genexpression der Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“ mit klinischen und histopathologischen Parametern der analysierten Patienten. Es zeigt sich ein signifikant höhere Genexpression bei Patienten mit multiplem LK-Befall im Vergleich zu Patienten ohne LK-Befall.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass keine Korrelation der normalisierten Genexpression von Her2 mit klinischen und histopathologischen Parametern nachgewiesen werden konnte. Allein der Lymphknotenstatus korrelierte in der Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“ mit höheren Ct-Werten.

3.3.3 Überlebensanalyse

3.3.3.1 Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“

Zur Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier innerhalb der Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“ wurde das Patientenkollektiv anhand des Mittelwertes der gemessenen, normalisierten Ct-Werte der Her2-Genexpression in zwei Gruppen eingeteilt. Wie in Abb. 10 dargestellt, hatten Patienten mit einer geringeren Her2-Expression ein besseres krebsspezifisches Überleben als Patienten mit höherer Her2-Expression. Der Log-Rank-Test ergab einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen. ($p = 0,0273$)

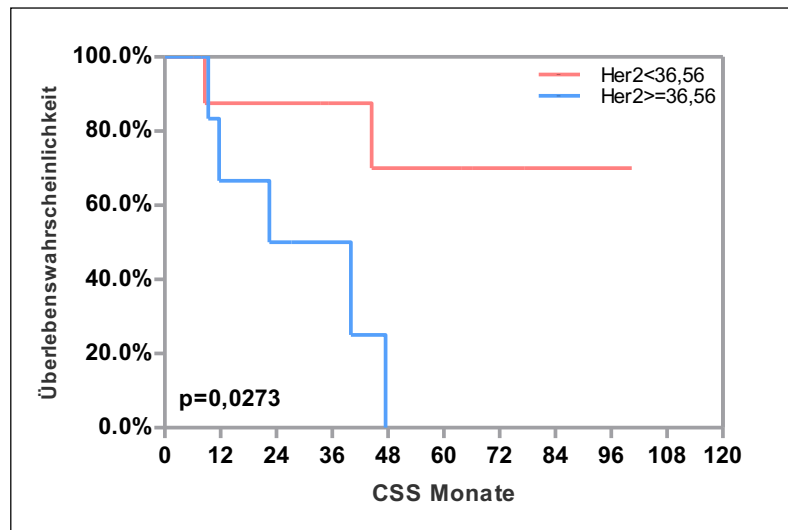


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurven für das krebspezifische Überleben (DSS) der Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“ in Prozent. DSS in Monaten. Das 5-Jahres-Überleben lag für Patienten mit überdurchschnittlicher Her2-Expression bei 0%, bei Patienten mit unterdurchschnittlicher Expression bei 85%. $p = 0,0273$

3.3.3.2 Messreihe „Mannheim PCR“

In die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier wurden 105 Patienten der Messreihe „Mannheim PCR“ inkludiert. Nach Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen mit je 50 % höherer und geringerer Her2-Genexpression konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des krebspezifischen Überlebens (CSS) festgestellt werden. ($p = 0,0337$) (Abb. 11)

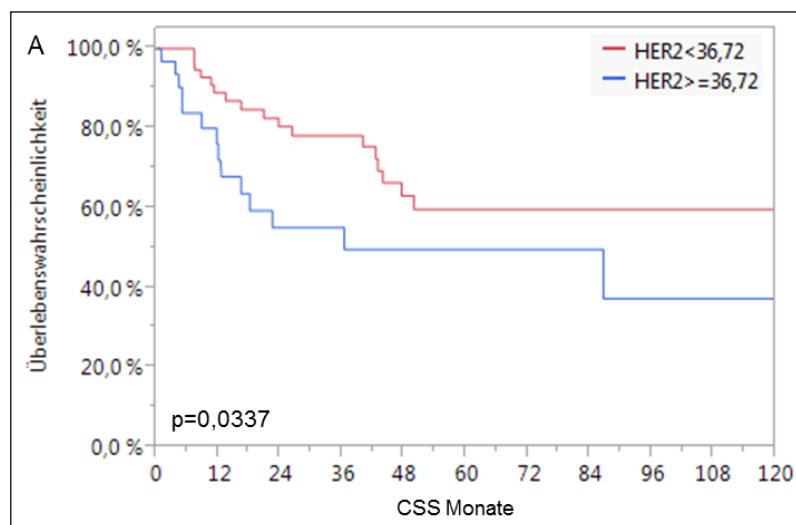


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven für das krebspezifische Überleben (CSS) der Messreihe „Mannheim PCR“ in Prozent. CSS in Monaten. Das 5-Jahres-Überleben lag für Patienten mit hoher Her2-Expression (<36,72) bei 49,6% und für Patienten mit niedriger Her2-Expression (≥36,72) bei 59,7%. $p = 0,0337$.

Die Darstellung des rezidivfreien Überlebens (RFS) zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. ($p = 0,01$) (Abb. 12)

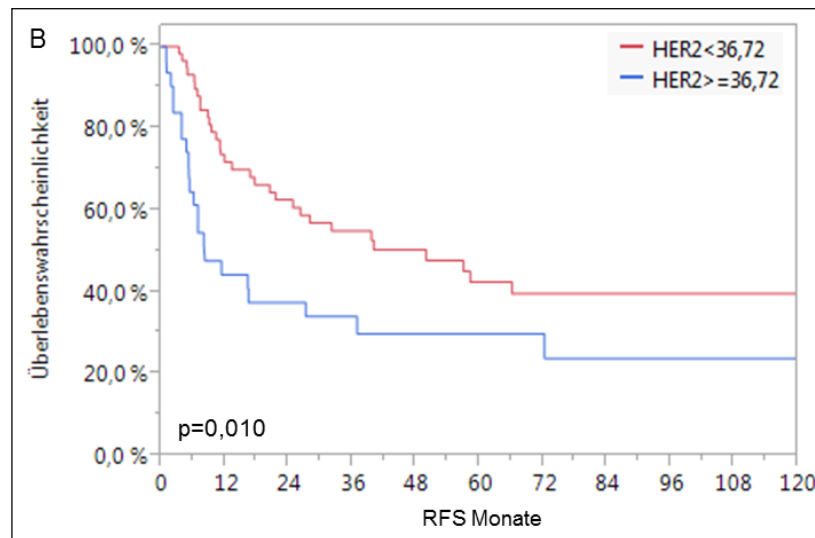


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben (RFS) der Messreihe „Mannheim PCR“ in Prozent. RFS in Monaten. Das 5-Jahres-Überleben lag für Patienten mit hoher Her2-Expression (<36,72) bei 29,8% und für Patienten mit niedriger Her2-Expression (>36,72) bei 40%. $p = 0,01$.

3.3.4 Interlaborvergleich

Statistische Analysen für den Interlaborvergleich wurden ausschließlich anhand der Proben durchgeführt, die sowohl durch die TaqMan-PCRs als auch durch die Versuche des Partnerlabors quantifizierbare Ergebnisse lieferten. Die Korrelationsanalysen erfolgten mit nicht-normalisierten und normalisierten Ct-Werten ($40 - \Delta CT$) sowie mit über die Standardreihe ermittelten Werten der absoluten Kopienanzahl im Verhältnis zum Haushaltsgen (Her/Calm-Ratio).

3.3.4.1 Vergleich „Mannheim Extraktion und PCR“ mit „Mannheim PCR“

Insgesamt wurden für diesen Vergleich 18 Proben in die Analyse inkludiert, deren Expressionswerte in beiden Messreihen bestimmt worden war. Die Korrelationsanalyse zeigte bei den normalisierten Werten im Gegensatz zu den nicht-normalisierten Ct-Werten eine signifikante Korrelation ($p = 0,0056$ vs. $0,0827$) sowie einen höheren Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten ($0,62$ vs. $0,42$). (vgl. Abbildung 17 im Anhang)

Darüber hinaus ergab die Korrelationsanalyse der über die Integration des Standards ermittelten Absolutwerte einen höheren Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten als die ermittelten Ct-Werte. (0,62 vs. 0,87) (Abb. 13)

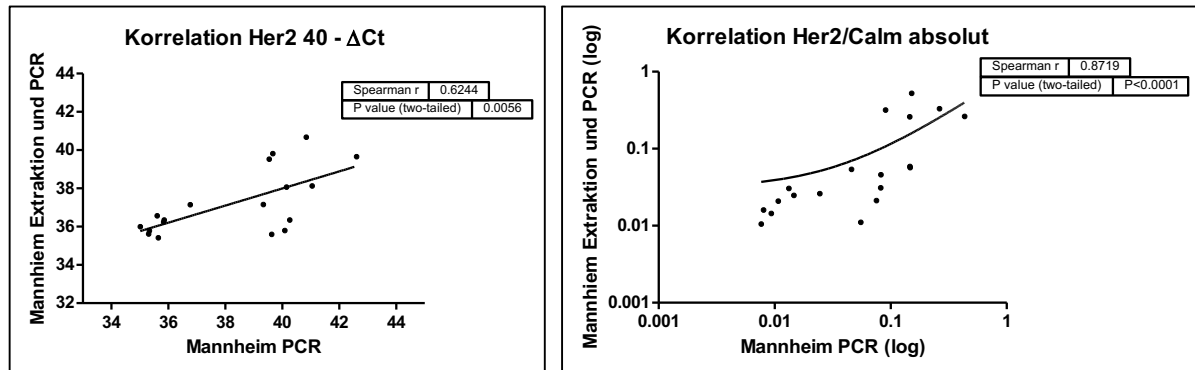


Abbildung 13: Korrelationsdiagramm der Messreihen „Mannheim Extraktion und PCR“ und „Mannheim PCR“ für Her2 als 40- Ct (links) und absolute Her2/Calm-Ratio (rechts). Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient liegt für die absolut bestimmten Werte mit 0,87 höher, als für die Ct-Werte mit 0,62. $p < 0,0001$ vs. $= 0,006$. Die Verzerrung der Korrelationsgerade im rechten Bild entsteht durch die Logarithmierung der auf die unlogarithmierten Originalwerte gelegten Gerade.

Die Darstellung der Korrelationen auf Bland-Altman-Diagrammen zeigt, dass die Übereinstimmung der Messreihen bei niedriger Her2-Expression besser ist als bei höherer Her2-Expression. (Abb. 14) Weiterhin fällt der Übereinstimmungsbereich („95% Limits of Agreement“, 95%-LA) bei normalisierten Ct-Werten deutlich enger aus, als bei nicht-normalisierten Ct-Werten. (-10,6; 5,7 vs. -2,6;4,7) (vgl. Abb. 18 im Anhang) Der 95%-Übereinstimmungsbereich begrenzt den Mittelwert der Differenzen $\pm 1,96$ Standardabweichungen und indiziert den Bereich, in dem 95 % der Differenzen bei zukünftigen Messungen erwartet werden.

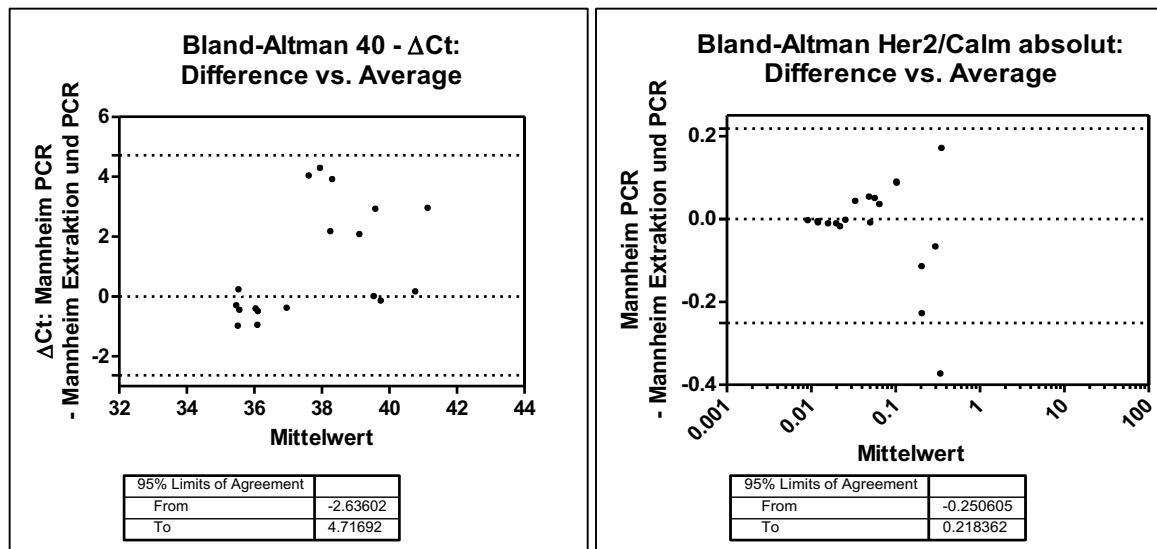


Abbildung 14: Bland-Altman-Diagramm der Messreihen „Mannheim PCR“ – „Mannheim Extraktion und PCR“ als normalisierte Ct-Werte (li) und absolute Kopienanzahl als Verhältnis von Her2 zu Calm (re). Durch die Normalisierung verringert sich die Varianz der Differenzen, die durch den 95%-Übereinstimmungsbereich (95%Limits of Agreement) abgebildet wird.

3.3.4.2 Vergleich „Mannheim PCR“ mit „Köln Extraktion und PCR“

Von den 86 überschneidenden Datenpaaren konnten bei mangelnder Ergebnisqualität für diesen Vergleich insgesamt 80 Proben in die Analyse inkludiert werden. Grundsätzlich zeigte sich für den Vergleich der in Mannheim gemessenen Proben mit den im Kölner Labor gemessenen Proben eine schwächere Korrelation als gegenüber den in Mannheim durchgeführten Messreihen. (s.o.)

Es ergab sich sowohl für nicht-normalisierte als auch für normalisierte Werte eine signifikante Korrelation zwischen beiden Messreihen. ($p = 0,0021$ vs. $<0,0001$, vgl. Abb. 18 im Anhang) Der Spearman-Rangkoeffizient für die normalisierten Ct-Werte lag bei 0,51 und damit niedriger als beim Vergleich der beiden Mannheimer Messreihen (0,62). (Abb. 15)

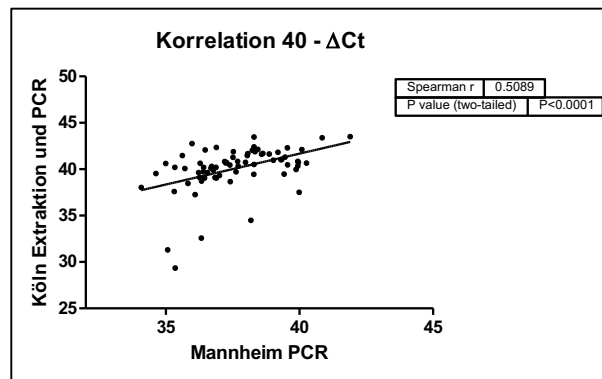


Abbildung 15: Korrelationsdiagramm der Messreihen „Köln Extraktion und PCR“ und „Mannheim PCR“ für Her2 als nicht-normalisierte (links) und zu Calm normalisierte Ct-Werte (rechts). Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient liegt für die normalisierten Werte mit 0,51 höher als für die nicht-normalisierten Werte mit 0,36. $p < 0,0001$ vs. $p = 0,0021$

Die Gegenüberstellungen zeigen, dass die Messreihen im Interlaborvergleich durchgehend signifikante Korrelationen aufweisen. Dabei wurden in den Vergleichen zum Partnerlabor in Köln schwächere Korrelationen verzeichnet als beim Vergleich der in Mannheim erhobenen Daten.

Darüber hinaus konnten sich die Varianzen zwischen separat durchgeführten Versuchsreihen durch die Integration eines externen Standards sowie durch Normalisierung anhand eines Haushaltsgens verringern lassen. Im Bereich niedriger Her2-Expression konnte eine größere Übereinstimmung der Messreihen festgestellt werden als im Bereich höherer Her2-Expression.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Her2-Gens auf mRNA Ebene in muskelinvasiven Urothelkarzinomen untersucht, um 1.) die Assoziation des Expressionsgrades mit der Histopathologie und dem klinischen Verlauf der Patienten zu bestimmen, 2.) die dynamische Breite und Sensitivität der RT-PCR zu evaluieren und 3.) die Varianz und Sensitivität der Expressionsmessung im Interlaborvergleich zu charakterisieren.

4.1 Prognostische Rolle von Her2 im Urothelkarzinom

4.1.1 Klinische und histopathologische Parameter

Es zeigen sich in den Stichproben nur vereinzelt signifikante Unterschiede der Her2-Genexpression hinsichtlich der ausgewählten Parameter. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen anderer Studien überein, in denen keine oder nur eine geringe Konkordanz des mRNA-Expressionsstatus mit einzelnen klinischen und histopathologischen Parametern der Patienten festgestellt wurde.^{74, 82, 83} Ursächlich dafür könnte sein, dass die durch die RT-PCR gemessene Expression der Her2-RNA keine automatische Voraussetzung für die Expression des funktionellen Her2-Proteins ist. Tatsächlich kann sich die Höhe der Genexpression durch posttranslationale, bisher unbekannte Mechanismen deutlich von der Menge des vorhandenen Proteins unterscheiden.⁸⁴ Darüber hinaus wurde berichtet, dass eine gesteigerte Her2-RNA-Expressionsrate nur gemeinsam mit gleichzeitig gesteigerten Her3- und Her4-Expressionsraten mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert ist.⁸² Die gleichzeitige Evaluierung der RNA-Expression anderer Wachstumsfaktorrezeptoren in großen multizentrischen Studien kann daher als potentieller Fokus weitergehender Forschung die Validität dieser Aussagen überprüfen. Überdies wurde gezeigt, dass nicht nur der mRNA-Expressionsstatus, sondern auch die mittels IHC und FISH gemessenen Proteinexpression bzw. Genamplifikation eine geringe Konkordanz zum klinischen Outcome der Patienten zeigt.^{74, 85}

Basis der molekulargenetischen Analyse in dieser Arbeit war ein an der Universitätsmedizin Mannheim rekrutiertes Patientenkollektiv von 128 zystektomierten Urothelkarzinom-Patienten. Die Rahmendaten des Kollektivs umfassen Angaben zu

Alter, Geschlecht, und histopathologischem Ausprägungsgrad des Tumors (Status, Grade, Metastasierung, Lymphknotenstatus, lymphovaskuläre Invasion). Dabei wurde keine weitere Einteilung der Karzinome in Tumorsubtypen vorgenommen. Jüngere Studien zeigen jedoch, dass die molekulare Typisierung in luminale und basale Subtypen durchaus prognostische und therapeutische Relevanz haben kann.⁸⁶ Darüber hinaus sind die histopathologischen Eigenschaften innerhalb des genutzten Patientenkollektivs ungleich verteilt: lediglich 2 Patienten hatten einen pathologisch gesicherten T1-Status und nur ein einziger Patient war von einem Carzinoma in Situ betroffen. Vor allem eine weitere, genauere Evaluation hinsichtlich spezifizierter pathologischer und molekularer Tumorsubtypen, v.a. in luminale und basale Karzinome, kann hier weitere Erkenntnisse bezüglich einer Assoziation zu klinischen Parametern liefern.

Eine weitere Limitation stellt die Retrospektivität der Arbeit dar. Diese begrenzt die Validität der Ergebnisse und erschwert Aussagen über Kausalzusammenhänge. Gleichzeitig beschränkt sich diese Arbeit auf die Beurteilung einer einzigen Methode zur Evaluation des Her2-Status. Um weitere Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Messmethoden und klinischen Parametern der Patienten zu erhalten, sollten prospektive Studien mit einer größeren Studienpopulation und Teststärke durchgeführt werden.

4.1.2 Her2-spezifisches Tumorüberleben

Anders als bei der Korrelation zu histopathologischen Parametern zeigte die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier signifikant verringerte 5-Jahres-Überlebensraten für Patienten mit hohem Her2-Genexpressionsstatus. Diese Ergebnisse bestätigen eine hohe Her2-Expression als ungünstigen Prognosefaktor für Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom nach radikaler Zystektomie. Einige Studien mit IHC und FISH wiesen bisher ähnliche Korrelationen auf.⁷²

Vergleichbare Ergebnisse sind auch für Mamma- und Magenkarzinom bekannt, bei denen eine zielgerichtete Therapie mit Trastuzumab oder Lapatinib erfolgreich das tumorspezifische Überleben verlängern kann.^{70, 87, 88} Auch im Urothelkarzinom ist für einzelne Patienten ein Ansprechen auf derartige Therapieregime beschrieben.^{89, 90} Eine Phase-II-Studie zeigte ein prolongiertes progressionsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben bei Kombinationstherapie mit Trastuzumab, Paclitaxel, Carboplatin

und Gemcitabine.⁹⁰ Auf der anderen Seite existieren auch negative Therapiestudien für Her2-überexprimierte Karzinome.^{70, 91} Dabei wird unter anderem die Fokussierung auf IHC und FISH in bisherigen Therapiestudien für das fehlende Ansprechen auf die gegen Her2 gerichteten Therapien verantwortlich gemacht. Ungeeignete Einschlusskriterien, wie z.B. inadäquate Cutoff-Level, können dabei die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken. Weitere Gründe für die negativen Ergebnisse der Studien sind beschriebene Mutationen, Fusionsgene und Copy Number Variations (CNVs).^{39, 40, 84, 92} Darüber hinaus sind Unterschiede der Tumorpathologien zwischen Tumorsubtypen innerhalb der Kohorte relevant. So ist das in ca. 5 % der Fälle auftretende mikropapilläre Urothelkarzinom mit einer höheren Her2-Alterationsrate (30 - 40 %) und einer schlechteren Prognose assoziiert.⁹³ Eine weitergehende Analyse von Alterationen auf DNA, RNA und Proteinlevel über IHC und FISH hinaus kann daher für die Patientenselektion zielgerichteter Therapien nützlich sein und um die Relevanz von Her2 als Kanzerogen und therapeutisches Target im Urothelkarzinom zu bestimmen.

Neben den klassischen Trastuzumab-basierten Therapieregimen werden derzeit alternative Kombinationswirkstoffe, wie z.B. Trastuzumab-Emtansin (T-DM1), zur Behandlung des Urothelkarzinoms evaluiert. Präklinische Studien an Urothelkarzinom-Zelllinien zeigten dabei signifikante antitumoröse Effekte, sogar an Cisplatin-resistenten Zellen.⁷⁷ Darüber hinaus konnte der Tyrosinkinaseinhibitor Afatinib in einer Phase-II-Studie das progressionsfreie Überleben von Her2-überexprimierten Patienten ebenfalls verlängern.⁹⁴ Ebenso konnte eine Korrelation von karzinomspezifischem Überleben mit der mittels PCR gemessenen Ko-Expression von Her2 und Her3/Her4 gezeigt werden.⁸² So zeigen Patienten mit hoher Her2-Expression und hoher Her3- und Her4-Expression eine bessere Prognose als Patienten mit hoher Her2-, aber niedriger Her3- und Her4-Expression.

Um die Variabilität des Urothelkarzinoms hinsichtlich seines Ansprechens auf diverse Therapieansätze weiter zu untersuchen, ist auch hier eine weitere Spezifizierung von Tumorsubtypen sinnvoll.

4.2 Die RT-PCR als Methode zur Evaluation des Her2-Status

Der quantitative Nachweis auf mRNA-Ebene bietet den Vorteil einer hohen Sensitivität, welche durch das untere Detektionslimit repräsentiert wird. In den Versuchen

wurde dieses mit 10^1 Kopien für Her2 und Calmodulin identifiziert. Darüber hinaus konnte mit Variabilitätskoeffizienten von 0,563% (T24) und 0,523% (RT112) für Her2 sowie 0,362% (T24) und 0,058% (RT112) für Calmodulin eine niedrige Intra-Assay-Variabilität innerhalb der Messreihe „Mannheim PCR“ erreicht werden (Tab. 7). Ebenso war auch der Inter-Assay-Variabilitätskoeffizient mit 2,615% für Her2 und für 1,43% für Calmodulin sehr niedrig (Tab. 8), was für eine für beide Zielgene durchweg hohe Reproduzierbarkeit dieser Messreihe spricht und mit vergleichbaren TaqMan-Assays aus der Literatur übereinstimmt.^{95, 96}

Grundsätzlich zeigte sich eine bessere Übereinstimmung der beiden in Mannheim durchgeführten Messreihen untereinander als im Vergleich zur Messreihe „Köln Extraktion und PCR“. So zeigen die Korrelationsdiagramme für normalisierte Ct-Werte für den Vergleich der Mannheimer Messreihen einen Rangkorrelationskoeffizienten von 0,62 und für Absolutwerte 0,87, während der Koeffizient für den Vergleich der Messreihen „Mannheim PCR“ und „Köln Extraktion und PCR“ 0,51 beträgt. (Abb.13 und 18)

Darüber hinaus ergab sich ein höherer Spearman-Rangkorrelationskoeffizient bei den per Standard ermittelten Absolutwerten als bei den relativen Ct-Werten ($r = 0,8719$ vs. $0,6244$) für den Vergleich der Messreihen „Mannheim PCR“ und „Mannheim Extraktion und PCR“. Die Etablierung eines Standards konnte damit eine bessere Vergleichbarkeit im Sinne der Inter-Labor-Präzision herbeiführen.

Ebenso ergab sich bei Werten, die zum Referenzgen Calmodulin normalisiert waren, ein höherer Rangkorrelationskoeffizient ($0,36$ vs. $0,51$) sowie ein engerer 95%-Übereinstimmungsbereich im Bland-Altman-Diagramm ($-4,46; 6,39$ vs. $-6,84; 1,86$ und $-10,6; 5,7$ vs. $-2,6; 4,7$), d.h. eine geringere Variabilität der Differenzen zwischen den korrespondierenden Wertepaaren der Messreihen. Auch die Normalisierung konnte damit Präzision und Reliabilität steigern. Dennoch sind die 95%-Übereinstimmungsbereiche der Bland-Altman-Diagramme zwischen den einzelnen Messreihen trotz Normalisierung zum Referenzgen vergleichsweise weit. Die Variabilität von bis zu 6 Zyklen (Abb. 14) entspricht sechs Zweierpotenzen des Ausgangsmaterials und deutet auf hohe Differenzen zwischen korrespondierenden Wertepaaren hin, während die durchschnittliche Korrelation, beschrieben durch den Spearman-Koeffizienten, durchgehend signifikant ist.

Zusammenfassend konnten zufriedenstellende Inter- und Intra-Labor-Variabilitäten erreicht werden. Eine Verbesserung der Korrelationen wurde durch die Integration von Standards erreicht.

Ursächlich für die ausgeprägte Variabilität können zum einen methodische Unterschiede der Messungen sein, wie z.B. die Nutzung unterschiedlicher Protokolle mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen und Magnesium-Konzentrationen zwischen dem eigenen und dem Kölner Labor. Die Polymerasekettenreaktion ist eine in vielen Bereichen der molekularen Medizin etablierte Methode zur Amplifikation von Genmaterial. Nichtsdestotrotz ist sie durch die Abhängigkeit von multiplen Faktoren sensibel und stark störanfällig. Diverse Faktoren, wie schwankende Templatmengen, Verunreinigungen, die Ausbildung von Primer-Dimeren, Temperaturschwankungen und Fehler in der Auswertungstechnik, können die Genauigkeit der PCR enorm beeinflussen. Auch die Nutzung unterschiedlicher Primer kann durch alternierte Bindungsaffinität und Effizienz veränderte PCR-Resultate ergeben. Um derartige Störfaktoren zu minimieren, wurden die Versuche initial durch gezielte Einstellung kritischer Faktoren, wie Selektion geeigneter Primer, Annealingtemperatur, Menge des zugegebenen Magnesiums und Herstellung eines externen Standards für die gewünschte Fragestellung optimiert. Die Inter- und Intra-Assay-Variabilitäten zeigten dabei zufriedenstellende Amplifikationseffizienzen. Dennoch bleibt durch die hohe Störanfälligkeit ein minimierter Grad an Unsicherheit, welche die Analysebedingungen erschweren kann.

Bei der Herstellung geeigneter Standards sowie zur Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität der RT-PCR wurden aus Tumorgewebe etablierte Zelllinien eingesetzt. Die Arbeit mit Zelllinien ist eine der meist genutzten Methodologien zur Erforschung molekularer Mechanismen. Die Übertragbarkeit der im Rahmen der Kultivierung gewonnenen Ergebnisse auf die tatsächlichen Gegebenheiten in vivo ist jedoch eingeschränkt. Durch die Züchtung über viele Generationen und den damit verbundenen Selektionsdruck bei der Etablierung können Mechanismen der Resistenzbildung zur molekularen Veränderung der Zellkonformität führen. Die so entwickelten Unterschiede zum Ausgangsgewebe können zu einer Diskrepanz von in vitro zu in vivo gewonnenen Ergebnissen führen.

Darüber hinaus erfolgten die PCRs an FFPE-Tumorproben, die trotz direkter Ausstrahlung aus dem Tumorgewebe auch Nukleinsäuren von nicht-Tumorzellen enthalten können, z.B. von Stroma- oder Entzündungsstellen. Diese Verdünnung des Tumorzellanteils kann dazu führen, dass die tatsächliche Menge der Her2-mRNA unterschätzt und damit die Aussagekraft einer Quantifizierung auf Genebene eingeschränkt wird. Durch eine Laser-Mikrodissektion mit Exzision suspekt erscheinender Zellen aus dem Präparat könnte eine exaktere Bestimmung der gewünschten mRNA-Konzentration erreicht werden.⁹⁷ Überdies wurden die Expressionsdaten der Messreihe „Mannheim Extraktion und PCR“ aus neuen Schnitten derselben FFPE-Blöcke gewonnen. Die wiederholte Aufbereitung derselben Blöcke kann dazu führen, dass sich die Ausgangskonzentration der Nukleinsäure-Targets in den makroskopisch alternierenden Schnitten unterscheidet.⁹⁸ Gleichzeitig birgt die Einbettung von Gewebeproben in Formalin auch ein Degenerationsrisiko für Nukleinsäuren. Auch gewebespezifische Enzyme sowie die Dauer und Temperatur der Archivierung haben Auswirkungen auf die Stabilität der RNA.⁹⁹

Neben der Stabilität des Ausgangsmaterials kommt auch der Auswahl der Referenzgene eine wichtige Bedeutung zu. Durch die Bestimmung der Ziel-RNA im Verhältnis zur RNA des Referenzgens sollen Schwankungen in der Menge des Ausgangsmaterials zwischen verschiedenen Proben ausgeglichen werden. Dem unterliegt die Annahme, dass das Referenzgen in allen Zellen kontinuierlich im selben Umfang exprimiert wird. Die Normalisierung zu einzelnen Referenzgenen ist allgemein hin als etablierte Methode anerkannt, wird aber dennoch für die stark schwankenden RNA-Level in vielen Gewebearten, unabhängig vom Referenzgen selbst, kritisch gesehen.¹⁰⁰ Dennoch wurde in dieser Arbeit eine höhere Inter-Labor-Präzision durch Normalisierung zum jeweils gleichen Referenzgen (Calmodulin) erreicht. Durch die Einbeziehung weiterer etablierter Referenzgene, wie z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GADPH) oder Phosphoglycerokinase (PGK), könnten diese Ergebnisse zusätzlich validiert werden.

Weiterhin problematisch ist die Nutzung unterschiedlicher Versuchsprotokolle und z.T. auch Versuchsmaterialien bei der Durchführung der Messungen. Während die in Mannheim durchgeführten Versuche sich lediglich in Konzentration und Volumen der

einzelnen Bestandteile der Reaktionsansätze unterschieden, erfolgten die Versuche im Labor in Köln nach einem differenten Protokoll und mit dem PCR-Gerät eines anderen Herstellers. Obwohl die relative Expression der einzelnen Proben zueinander unabhängig vom Gerät messbar sein sollte, könnten die Spezifitäten hinsichtlich Sensitivität und Reliabilität der Geräte insbesondere bei der Messung absolut quantifizierter DNA-Stränge zu inkongruenten Übereinstimmungen führen.

Die starke Laborabhängigkeit von Her2-Detektionsresultaten ist nicht neu: Es werden für Immunassays beim Mammakarzinom Fehlerquoten von bis zu 26% angegeben.¹⁰¹ Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die diagnostische Variabilität dieser Assays durch Einführung standardisierter histologischer Kriterien deutlich reduziert werden konnte, was zur Definition der ACSO-Färbestandards führte (s. Einleitung S. 8). Eine Standardisierung in RT-PCR Assays kann einerseits durch die in dieser Arbeit erfolgte Integration von Standardverdünnungsreihen, andererseits durch die Definition von Standardprotokollen und einheitlichen Materialien und Reagenzien umgesetzt werden. Letzteres ist jedoch bei dem ausgedehnten Angebot der auf dem aktuellen Markt erhältlichen Produkte eine eher unrealistische Vision. Darüber hinaus könnte eine Standardisierung über die Einführung von externen Kontrollen erreicht werden, die in absoluten Werten – basierend auf validierten Referenzmaterialien mit bekanntem Wert – verankert sind. Ein derartiger Kontrollwert existiert bereits zur Kontrolle der Ansprechrate auf Chemotherapeutika bei chronischer myeloischer Leukämie.¹⁰² Hierbei wurde ein internationaler Standard definiert, welcher den Abgleich laborspezifischer Ergebnisse unter Beibehaltung der eigenen etablierten Methodik erlaubt. Der Abgleich erfolgt mittels laborspezifischer Konversionsfaktoren, die durch den Austausch von Proben mit Referenzlaboren ermittelt werden.¹⁰³

Neben der Variabilität innerhalb von RT-PCR Assays existiert Unklarheit bezüglich der Korrelation der RT-PCR mit anderen Methoden zur Her2-Expressionsanalyse. Während die Ergebnisse von IHC und FISH im Mammakarzinom in den meisten Studien übereinstimmen, zeigt die durch die RT-PCR gemessene mRNA-Expression oftmals keinen klaren Zusammenhang zur Proteinexpression.^{51, 52, 104} Aus diesem Grund wird die Nutzung der RT-PCR auch in der Her2-Diagnostik des Mammakarzinoms zur klinischen Patientenselektion bislang aufgrund fehlender Evidenz bezüglich der Überlegenheit zu alternativen Testverfahren nicht empfohlen.¹⁰⁵ Im Urothelkarzi-

nom hingegen scheint die Korrelation zwischen IHC und FISH geringer zu sein als im Mammakarzinom.^{106, 107} Ebenso ist auch die Konkordanz von PCR mit IHC und FISH schwankend.^{108, 109} Im Urothelkarzinom wurden Vergleichsstudien jedoch bislang nur mit RT-PCR auf der Basis von DNA-Proben durchgeführt.^{108, 109} Vor diesem Hintergrund können weitergehende komparative Studien mit Reverse Transkriptase RT-PCR auf mRNA-Basis Aufschlüsse über diverse Methodologien zur klinischen Patientenselektion im Urothelkarzinom liefern.

Neben Variabilitäten im Interlaborvergleich und einzelnen aufgezeigten Schwächen zeigen die hohe Sensitivität über einen breiten dynamischen Bereich und die gute Reproduzierbarkeit, dass die RT-PCR zur Analyse des Her2-Status aus technischer Sicht eine zuverlässige Methode ist. Die Inter-Assay-Variabilität der relativen Amplifikationswerte lag in dieser Arbeit durchgehend bei $< 3\%$, die Intra-Assay-Variabilität sogar bei $< 1\%$. Sie liegt damit deutlich unter den Koeffizienten anderer Her2-PCR-Assays.^{97, 110} Gleichzeitig konnten hohe Amplifikationseffizienzen von $E = 2,01$ (Calm) und $E = 1,97$ (Her2) erreicht werden. Auch diese Ergebnisse sprechen für eine reliable Quantifizierung der Her2-PCR und entsprechen den Aussagen anderer Autoren nach Entwicklung ähnlicher TaqMan PCR-Assays.¹¹¹ Neben Sensitivität und dynamischer Breite zeigt die Analyse mittels RT-PCR eine geringere Untersucherabhängigkeit im Vergleich zur IHC.⁵⁰ Weitere Vorteile der PCR gegenüber IHC/FISH sind insbesondere ihre Effizienz durch simultane Bestimmung multipler Proben in einem PCR-Lauf, die starke Standardisierung und die automatische Kalkulierung der Ergebnisse im Computer. Darüber resultieren die geringen Kosten der Methode in einer überlegenen Kosteneffektivität.¹¹²

Die erhobenen RT-PCR Daten zeigen, dass die quantitative RT-PCR eine sensitive und reliable Methode mit hoher dynamischer Breite zur Detektion von Her2 im Urothelkarzinom ist, deren Validität jedoch durch den Nutzen unterschiedlicher Protokolle, Reagenzien und Geräte eingeschränkt ist. Es wird deutlich, dass eine Standardisierung im Sinne definierter Richtlinien zur Durchführung und Auswertung von RT-PCR-Versuchen bei der Expressionsanalyse im Urothelkarzinom zur klinischen Entscheidungsfindung notwendig ist.

4.3 Ausblick

Neben der technischen Zuverlässigkeit sind vor dem Hintergrund der vorhandenen Varianz der Expressionsergebnisse weitere Bemühungen zur Standardisierung der RT-PCR erforderlich. Eine weitere Validierung der Genexpressionsdaten mittels IHC, FISH oder Western Blot ist notwendig, um weitere Klarheit bezüglich der methodischen Unsicherheiten zu schaffen.

Ebenfalls zur weiterführenden Validierung könnten Studien mit Kontrollgruppen dienen, die dem Zielkollektiv eine gesunde Kohorte gegenüberstellen. So kann die tatsächliche Situation des Her2-Status im Urothelkarzinom im Vergleich zur gesunden Bevölkerung evaluiert werden. Bei der klinischen Entscheidungsfindung ist neben der mehrfach erwähnten Standardisierung von Versuchsprotokollen zudem die Definition einheitlicher Cutoff-Werte sinnvoll, um eine klare Stratifizierung von Expressionsprofilen hinsichtlich ihrer Eignung für auf Her2 gerichtete Therapien zu ermöglichen.

Es erscheint unwahrscheinlich, dass zukünftig einzelne molekulare Marker für Therapieentscheidungen und Prognosebestimmungen komplexer Neoplasien ausreichen. Mit Microarrays und Multigenpanels sind bereits erste Schritte zur simultanen Analyse multipler genetischer Abberationen unternommen worden. Jedoch gehen pathogenetische Mechanismen weit über das Feld rein genetischer Veränderungen hinaus. Studien wie die vorliegende können bei Ursachen- und Methodenforschung helfen.

Trotz des klaren Individualisierungstrends in der modernen Medizin sollten Handlungsempfehlungen immer aus der Zusammenschau aller klinischen und labormedizinischen Befunde heraus getroffen werden. Die medizinische Forschung fokussiert sich oftmals auf Daten zu harten Endpunkten, wie Hospitalisierungen und Mortalität, die keinesfalls die tatsächliche Lebenssituation der Patienten widerspiegeln. Die verstärkte Rücksichtnahme auf die subjektiv empfundene Lebensqualität hinsichtlich neuer therapeutischer Verfahren und Arzneimittel erscheint insbesondere im Sinne einer patientennahen Versorgung sowie aus gesundheitsökonomischer Perspektive äußerst notwendig. Schlussendlich sollte jedoch immer der Wille des Patienten ausschlaggebend für das ärztliche Handeln sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In Mamma- und Magenkarzinom konnten zielgerichtete Therapien gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu in den vergangenen Jahren die Mortalitätsraten erheblich verringern. Im Vergleich dazu weist das Urothelkarzinom der Harnblase aufgrund seiner hohen Rezidiv- und Progressionsrate und fehlender zielgerichteter Behandlungsansätze nach wie vor hohe Mortalitätszahlen auf. Dabei existieren diskrepante Daten zur (Über-)Expression von Her2 auf den Karzinomzellen, die u.a. auf die Nutzung unterschiedlicher Methodologien und laborspezifischer Protokolle bei der Detektion der Her2-Rezeptoren zurückgeführt werden können. Gleichzeitig wird diskutiert, inwiefern die Genexpression von Her2 tatsächlich mit dem histopathologischen und klinischen Outcome der Patienten korreliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels sensitiver quantitativer Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion den Her2-Rezeptorstatus an einer retrospektiven Patientenkohorte mit muskelinvasivem Karzinom zu erheben und mit den histopathologischen und klinischen Parametern zu korrelieren. Darüber hinaus sollte die RT-PCR als Detektionsmethode für die Her2-Expression evaluiert und über den Vergleich verschiedener Messreihen innerhalb der Kohorte der Einfluss differenter Versuchsbedingungen und –protokolle auf die Korrelation der Messreihen untereinander ermittelt werden.

Mittels Reverser-Transkriptase Polymerasekettenreaktion wurde die Her2-Expression anhand von bereitgestellten RNA-Proben eines Kollektivs mit 128 Urothelkarzinompatienten mit muskelinvasiven Tumoren nach Radikaler Zystektomie analysiert. Eine zweite Messreihe erfolgte mittels eigener RNA-Extraktion und alternierter Reverser-Transkriptase Polymerasekettenreaktion bei einer Subpopulation des Kollektivs. Anhand einer Datenbank mit klinischen und histopathologischen Daten des Patientenkollektivs wurden die Expressionsergebnisse bezüglich ihres Zusammenhangs mit den entsprechenden Outcome-Parametern der Patienten ausgewertet. Es erfolgte außerdem eine Analyse nach krebsspezifischem Überleben. Darüber hinaus erfolgte eine Korrelationsanalyse der beiden durchgeführten Messreihen untereinander sowie mit einer Referenzmessreihe eines Partnerlabors.

Es zeigte sich nach der Etablierung der RT-PCR eine hohe Sensitivität der Versuche über den gesamten Bereich von 6 Log-Stufen mit niedrigen Inter- und Intra-Assay-

Variabilitäten. Dennoch zeigte sich in der Expressionsanalyse von Her2 eine Heterogenität des Expressionsmusters mit Streuung der Ct-Werte. Klinisch sowie histopathologisch präsentierte sich in einer der Messreihen für den Lymphknotenstatus eine positive Assoziation zu hoher Her2-Expression. Die Überlebensanalyse zeigte eine signifikant positive Korrelation zum Her2-Status. In der Korrelationsanalyse konnte eine signifikante Übereinstimmung der Messreihen festgestellt werden. Durch Normalisierung und die Einbringung eines externen Standards konnte die Übereinstimmung dabei unter den Messreihen deutlich gesteigert werden. Der Vergleich mit der Messreihe in einem anderen Labor erbrachte schwächere Übereinstimmungen.

Es besteht ein geringer Zusammenhang der Her2-Expression mit den klinisch-histopathologischen Patientendaten. Die Inter- und Intra-Assay-Variabilität sowie die Korrelationsanalyse zwischen den einzelnen Messreihen in dieser Arbeit zeigen, dass die RT-PCR aus technischer Hinsicht eine reliable und sensitive Methode mit hoher dynamische Breite zur Bestimmung des Her2-Status im Urothelkarzinom ist, wobei in dieser Pilotstudie durchaus Varianzen bei der Datengewinnung durch die Nutzung verschiedener Protokolle erzeugt wurden. Damit weist diese Studie auf die Notwendigkeit definierter Laborstandards und eine Standardisierung der diagnostischen Testung mittels RT-PCR hin. Im Vergleich zu alternativen Detektionsmethoden, wie Immunhistochemie oder Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung, bleibt bis zur Einführung einer RT-PCR für die Her2-Detektion im Sinne der klinischen Nutzbarkeit für das Urothelkarzinom Bedarf an weiteren Untersuchungen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kaatsch, P, Spix, C, Katalinic, A, Hentschel, S, Luttmann, S, Stegmaier, C: Krebs in Deutschland 2011/2012., Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015 pp 46 ff.
2. Eble, J: Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. *World Health Organization classification of tumours*. Lyon, France, 2004.
3. Burger, M, Catto, JWF, Dalbagni, G, Grossman, HB, Herr, H, Karakiewicz, P, Kassouf, W, Kiemeny, LA, La Vecchia, C, Shariat, S, Lotan, Y: Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology*, 63: 234-241, 2013.
4. Zeegers, MP, Tan Fe Fau - Dorant, E, Dorant E Fau - van Den Brandt, PA, van Den Brandt, PA: The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies.
5. Babjuk, M, Oosterlinck, W, Sylvester, R, Kaasinen, E, Böhle, A, Palou-Redorta, J: EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *European Urology*, 54: 303-314, 2008.
6. Merkblatt zur BK Nr. 1301: Schleimhautveränderungen, Krebs oder andere Neubildungen der Harnwege durch aromatische Amine - Merkblatt zu BK Nr. 1 der Anl. 1 zur 7. BKVO. In: ARBEITSMEDIZIN, B. F. A. U. (Ed.).
7. Negri, E, La Vecchia, C: Epidemiology and prevention of bladder cancer.
8. Bellmunt, J, Orsola, A, Leow, JJ, Wiegand, T, De Santis, M, Horwich, A: Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25 Suppl 3: iii40-48, 2014.
9. Sobin, LH, Gospodarowicz, MK, Wittekind, C: *TNM classification of malignant tumours*, John Wiley & Sons, 2011.
10. Sauter, G, Algaba, F, Amin, M, Busch, C, Chevillet, J, Gasser, T, Grignon, D, Hofstadter, F, Lopez-Beltran, A, Epstein, J: Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, IARC Press, Lyon: 90-150, 2004.
11. Knowles, MA, Hurst, CD: Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer*, 15: 25-41, 2015.
12. Kirkali, Z, Chan, T, Manoharan, M, Algaba, F, Busch, C, Cheng, L, Kiemeny, L, Kriegmair, M, Montironi, R, Murphy, WM, Sesterhenn, IA, Tachibana, M, Weider, J: Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66: 4-34, 2005.
13. Kausch, I, Sommerauer, M, Montorsi, F, Stenzl, A, Jacqmin, D, Jichlinski, P, Jocham, D, Ziegler, A, Vonthein, R: Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and cumulative analysis of prospective studies. *Eur Urol*, 57: 595-606, 2010.
14. Mowatt, G, N'Dow, J, Vale, L, Nabi, G, Boachie, C, Cook, JA, Fraser, C, Griffiths, TR: Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *International journal of technology assessment in health care*, 27: 3-10, 2011.
15. Sylvester, RJ, Oosterlinck, W, van der Meijden, AP: A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results

- of randomized clinical trials. *The Journal of urology*, 171: 2186-2190, quiz 2435, 2004.
16. Oosterlinck, W, Lobel, B, Jackse, G, Malmstrom, PU, Stockle, M, Strenberg, C: [EAU Recommendations 2001. "Guidelines on bladder cancer"]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*, 12: 1161-1163, 2002.
 17. Witjes, JA, Compérat, E, Cowan, NC, De Santis, M, Gakis, G, Le Bret, T, Ribal, MJ, Van der Heijden, AG, Sherif, A: EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *European urology*, 65: 778-792, 2014.
 18. Stimson, C, Chang, SS, Barocas, DA, Humphrey, JE, Patel, SG, Clark, PE, Smith, JA, Cookson, MS: Early and late perioperative outcomes following radical cystectomy: 90-day readmissions, morbidity and mortality in a contemporary series. *The Journal of urology*, 184: 1296-1300, 2010.
 19. Abern, MR, Owusu, RA, Anderson, MR, Rampersaud, EN, Inman, BA: Perioperative intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11: 477-484, 2013.
 20. Perlis, N, Zlotta, AR, Beyene, J, Finelli, A, Fleshner, NE, Kulkarni, GS: Immediate post-transurethral resection of bladder tumor intravesical chemotherapy prevents non-muscle-invasive bladder cancer recurrences: an updated meta-analysis on 2548 patients and quality-of-evidence review. *European urology*, 64: 421-430, 2013.
 21. Rosenblatt, R, Sherif, A, Rintala, E, Wahlqvist, R, Ullén, A, Nilsson, S, Malmström, P-U: Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-invasive urothelial bladder cancer. *European urology*, 61: 1229-1238, 2012.
 22. Balar, AV, Galsky, MD, Rosenberg, JE, Powles, T, Petrylak, DP, Bellmunt, J, Loriot, Y, Necchi, A, Hoffman-Censits, J, Perez-Gracia, JL: Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*, 389: 67-76, 2017.
 23. Stein, JP, Lieskovsky, G, Cote, R, Groshen, S, Feng, AC, Boyd, S, Skinner, E, Bochner, B, Thangathurai, D, Mikhail, M, Raghavan, D, Skinner, DG: Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19: 666-675, 2001.
 24. Lughezzani, G, Sun, M, Shariat, SF, Budaus, L, Thuret, R, Jeldres, C, Liberman, D, Montorsi, F, Perrotte, P, Karakiewicz, PI: A population-based competing-risks analysis of the survival of patients treated with radical cystectomy for bladder cancer. *Cancer*, 117: 103-109, 2011.
 25. Hafner, C, Knuechel, R, Stoehr, R, Hartmann, A: Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *International Journal of Cancer*, 101: 1-6, 2002.
 26. Hafner, C, Knuechel, R, Zanardo, L, Dietmaier, W, Blaszyk, H, Cheville, J, Hofstaedter, F, Hartmann, A: Evidence for oligoclonality and tumor spread by intraluminal seeding in multifocal urothelial carcinomas of the upper and lower urinary tract. *Oncogene*, 20, 2001.
 27. Kang, CH, Yu, TJ, Hsieh, HH, Yang, JW, Shu, K, Huang, CC, Chiang, PH, Shiue, YL: The development of bladder tumors and contralateral upper urinary tract

- tumors after primary transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Cancer*, 98: 1620-1626, 2003.
28. Lemmon, MA, Schlessinger, J: Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends in biochemical sciences*, 19: 459-463, 1994.
 29. Lemmon, MA, Schlessinger, J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141: 1117-1134, 2010.
 30. Salomon, DS, Brandt, R, Ciardiello, F, Normanno, N: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology*, 19: 183-232, 1995.
 31. Carpenter, G, Cohen, S: Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 265: 7709-7712, 1990.
 32. Bellmunt, J, Hussain, M, Dinney, C: Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer: therapy of bladder cancer by blockade of the epidermal growth factor receptor family. *Critical reviews in oncology/hematology*, 46: 85-104, 2003.
 33. Alroy, I, Yarden, Y: The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS letters*, 410: 83-86, 1997.
 34. Foreman, JC, Johansen, T, Gibb, AJ: *Textbook of receptor pharmacology*, 3d ed, Portland, Ringgold Inc, 2011.
 35. Voldborg, BR, Damstrup, L, Spang-Thomsen, M, Poulsen, HS: Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology*, 8: 1197-1206, 1997.
 36. Worthylake, R, Opresko, LK, Wiley, HS: ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 8865-8874, 1999.
 37. Sauter, G, Moch, H, Moore, D, Carroll, P, Kerschmann, R, Chew, K, Mihatsch, M, Gudat, F, Waldman, F: Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer research*, 53: 2199-2203, 1993.
 38. Bargmann, CI, Hung, M-C, Weinberg, RA: Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*, 45: 649-657, 1986.
 39. The Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma. *Nature*, 507: 315-322, 2014.
 40. Ross, JS, Wang, K, Gay, LM, Al-Rohil, RN, Nazeer, T, Sheehan, CE, Jennings, TA, Otto, GA, Donahue, A, He, J, Palmer, G, Ali, S, Nahas, M, Young, G, LaBrecque, E, Frampton, G, Erlich, R, Curran, JA, Brennan, K, Downing, SR, Yelensky, R, Lipson, D, Hawryluk, M, Miller, VA, Stephens, PJ: A High Frequency of Activating Extracellular Domain ERBB2 (HER2) Mutation in Micropapillary Urothelial Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20: 68-75, 2014.
 41. Hollywood, DP, Hurst, HC: A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines. *The EMBO Journal*, 12: 2369-2375, 1993.
 42. Feng, C, Neumeister, V, Ma, W, Xu, J, Lu, L, Bordeaux, J, Maihle, NJ, Rimm, DL, Huang, Y: Lin28 regulates HER2 and promotes malignancy through multiple mechanisms. *Cell cycle*, 11: 2486-2494, 2012.

43. Wang, Q, Zhou, J, Guo, J, Teng, R, Shen, J, Huang, Y, Xie, S, Wei, Q, Zhao, W, Chen, W: Lin28 promotes Her2 expression and Lin28/Her2 predicts poorer survival in gastric cancer. *Tumor Biology*, 35: 11513-11521, 2014.
44. Vadlamudi, R, Mandal, M, Adam, L, Steinbach, G, Mendelsohn, J, Kumar, R: Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene*, 18: 305, 1999.
45. Garcia-Recio, S, Fuster, G, Fernandez-Nogueira, P, Pastor-Arroyo, EM, Park, SY, Mayordomo, C, Ametller, E, Mancino, M, Gonzalez-Farre, X, Russnes, HG: Substance P autocrine signaling contributes to persistent HER2 activation that drives malignant progression and drug resistance in breast cancer. *Cancer research*, 73: 6424-6434, 2013.
46. Bilous, M, Dowsett, M, Hanna, W, Isola, J, Lebeau, A, Moreno, A, Penault-Llorca, F, Rüschoff, J, Tomasic, G, Van de Vijver, M: Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Modern pathology*, 16: 173-182, 2003.
47. Wolff, AC, Hammond, MEH, Schwartz, JN, Hagerty, KL, Allred, DC, Cote, RJ, Dowsett, M, Fitzgibbons, PL, Hanna, WM, Langer, A, McShane, LM, Paik, S, Pegram, MD, Perez, EA, Press, MF, Rhodes, A, Sturgeon, C, Taube, SE, Tubbs, R, Vance, GH, van de Vijver, M, Wheeler, TM, Hayes, DF: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 118-145, 2006.
48. Rudkin, GT, Stollar, B: High resolution detection of DNA–RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. 1977.
49. Panis, C, Pizzatti, L, Correa, S, Binato, R, Lemos, GF, Herrera, AC, Seixas, TF, Cecchini, R, Abdelhay, E: The positive is inside the negative: HER2-negative tumors can express the HER2 intracellular domain and present a HER2-positive phenotype. *Cancer Lett*, 357: 186-195, 2015.
50. Turashvili, G, Leung, S, Turbin, D, Montgomery, K, Gilks, B, West, R, Carrier, M, Huntsman, D, Aparicio, S: Inter-observer reproducibility of HER2 immunohistochemical assessment and concordance with fluorescent in situ hybridization (FISH): pathologist assessment compared to quantitative image analysis. *BMC cancer*, 9: 165, 2009.
51. Susini, T, Bussani, C, Marini, G, Nori, J, Olivieri, S, Molino, C, Bianchi, S, Vezzosi, V, Paglierani, M, Giachi, M: Preoperative assessment of HER-2/neu status in breast carcinoma: the role of quantitative real-time PCR on core-biopsy specimens. *Gynecologic oncology*, 116: 234-239, 2010.
52. Wirtz, RM, Sihto, H, Isola, J, Heikkilä, P, Kellokumpu-Lehtinen, P-L, Auvinen, P, Turpeenniemi-Hujanen, T, Jyrkkiö, S, Lakis, S, Schlombs, K: Biological subtyping of early breast cancer: a study comparing RT-qPCR with immunohistochemistry. *Breast cancer research and treatment*, 157: 437-446, 2016.
53. Liang, P, Pardee, AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971, 1992.
54. Frohman, MA, Dush, MK, Martin, GR: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85: 8998-9002, 1988.
55. Noonan, KE, Roninson, IB: mRNA phenotyping by enzymatic amplification of randomly primed cDNA.

56. Gibson, U, Heid, CA, Williams, PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*, 6: 995-1001, 1996.
57. Heid, CA, Stevens, J, Livak, KJ, Williams, PM: Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6: 986-994, 1996.
58. Holzapfel, B, Wickert, L: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37: 120-126, 2007.
59. Knezevic, D, Goddard, AD, Natraj, N, Cherbavaz, DB, Clark-Langone, KM, Snable, J, Watson, D, Falzarano, SM, Magi-Galluzzi, C, Klein, EA: Analytical validation of the Onco type DX prostate cancer assay—a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC genomics*, 14: 690, 2013.
60. Sparano, JA, Gray, RJ, Makower, DF, Pritchard, KI, Albain, KS, Hayes, DF, Geyer Jr, CE, Dees, EC, Perez, EA, Olson Jr, JA: Prospective validation of a 21-gene expression assay in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 373: 2005-2014, 2015.
61. Slamon, D, Clark, G, Wong, S, Levin, W, Ullrich, A, McGuire, W: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235: 177-182, 1987.
62. Slamon, DJ, Leyland-Jones, B, Shak, S, Fuchs, H, Paton, V, Bajamonde, A, Fleming, T, Eiermann, W, Wolter, J, Pegram, M, Baselga, J, Norton, L: Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*, 344: 783-792, 2001.
63. Jørgensen, JT: Targeted HER2 Treatment in Advanced Gastric Cancer. *Oncology*, 78: 26-33, 2010.
64. Ross, JS, Slodkowska, EA, Symmans, WF, Pusztai, L, Ravdin, PM, Hortobagyi, GN: The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist*, 14: 320-368, 2009.
65. Ridolfi, RL, Jamehdor, MR, Arber, JM: HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Modern Pathology*, 13: 866-873, 2000.
66. Krüger, S, Weitsch, G, Büttner, H, Matthiensen, A, Böhmer, T, Marquardt, T, Sayk, F, Feller, AC, Böhle, A: HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Prognostic implications. *International journal of cancer*, 102: 514-518, 2002.
67. Laé, M, Couturier, J, Oudard, S, Radvanyi, F, Beuzeboc, P, Vieillefond, A: Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Annals of Oncology*, 21: 815-819, 2010.
68. Latif, Z, Watters, AD, Dunn, I, Grigor, KM, Underwood, MA, Bartlett, JMS: HER2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *British Journal of Cancer*, 89: 1305-1309, 2003.
69. Coogan, CL, Estrada, CR, Kapur, S, Bloom, KJ: HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, 63: 786-790, 2004.
70. Oudard, S, Culine, S, Vano, Y, Goldwasser, F, Théodore, C, Nguyen, T, Voog, E, Banu, E, Vieillefond, A, Priou, F, Deplanque, G, Gravis, G, Ravaud, A, Vannetzel, JM, Machiels, J-P, Muracciole, X, Pichon, M-F, Bay, J-O, Elaidi, R, Teghom, C, Radvanyi, F, Beuzeboc, P: Multicentre randomised phase II trial of gemcitabine+platinum, with or without trastuzumab, in advanced or

- metastatic urothelial carcinoma overexpressing Her2. *European Journal of Cancer*, 51: 45-54, 2015.
71. Alexa, A, Baderca F Fau - Zahoi, DE, Zahoi De Fau - Lighezan, R, Lighezan R Fau - Izvernariu, D, Izvernariu D Fau - Raica, M, Raica, M: Clinical significance of Her2/neu overexpression in urothelial carcinomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 51: 277–282, 2010.
 72. Zhao, J, Xu, W, Zhang, Z, Song, R, Zeng, S, Sun, Y, Xu, C: Prognostic role of HER2 expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *International Urology and Nephrology*, 47: 87-94, 2014.
 73. Jimenez, RE, Hussain, M, Bianco, FJ, Vaishampayan, U, Tabazcka, P, Sakr, WA, Pontes, JE, Wood, DP, Grignon, DJ: Her-2/neu Overexpression in Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Prognostic Significance and Comparative Analysis in Primary and Metastatic Tumors. *Clinical Cancer Research*, 7: 2440-2447, 2001.
 74. Fleischmann, A, Rotzer, D, Seiler, R, Studer, UE, Thalmann, GN: Her2 Amplification is Significantly More Frequent in Lymph Node Metastases From Urothelial Bladder Cancer Than in the Primary Tumours. *European Urology*, 60: 350-357, 2011.
 75. Bolenz, C, Shariat, SF, Karakiewicz, PI, Ashfaq, R, Ho, R, Sagalowsky, AI, Lotan, Y: Human epidermal growth factor receptor 2 expression status provides independent prognostic information in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BJU International*, 106: 1216-1222, 2010.
 76. Hussain, MHA, MacVicar, GR, Petrylak, DP, Dunn, RL, Vaishampayan, U, Lara, PN, Chatta, GS, Nanus, DM, Glode, LM, Trump, DL, Chen, H, Smith, DC: Trastuzumab, Paclitaxel, Carboplatin, and Gemcitabine in Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor-2/neu-Positive Urothelial Carcinoma: Results of a Multicenter Phase II National Cancer Institute Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 2218-2224, 2007.
 77. Hayashi, T, Seiler, R, Oo, HZ, Jager, W, Moskalev, I, Awrey, S, Dejima, T, Todenhofer, T, Li, N, Fazli, L, Matsubara, A, Black, PC: Targeting HER2 with T-DM1, an Antibody Cytotoxic Drug Conjugate, is Effective in HER2 Over Expressing Bladder Cancer. 2015.
 78. Czechowski, T, Bari, RP, Stitt, M, Scheible, WR, Udvardi, MK: Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root-and shoot-specific genes. *The Plant Journal*, 38: 366-379, 2004.
 79. Livak, KJ, Schmittgen, TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
 80. Koutras, A, Kalogeras, KT, Wirtz, RM, Alexopoulou, Z, Bobos, M, Zagouri, F, Veltrup, E, Timotheadou, E, Gogas, H, Pentheroudakis, G: Evaluation of the prognostic significance of HER family mRNA expression in high-risk early breast cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) validation study. *Journal of translational medicine*, 13: 171, 2015.
 81. Tramm, T, Sorensen, BS, Overgaard, J, Alsner, J: Optimal reference genes for normalization of qRT-PCR data from archival formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors controlling for tumor cell content and decay of mRNA. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 22: 181-187, 2013.
 82. Memon, AA, Sorensen, B, Meldgaard, P, Fokdal, L, Thykjaer, T, Nexø, E: The relation between survival and expression of HER1 and HER2 depends on the

- expression of HER3 and HER4: a study in bladder cancer patients. *British journal of cancer*, 94: 1703-1709, 2006.
83. Rink, M, Chun, FK, Dahlem, R, Soave, A, Minner, S, Hansen, J, Stoupiec, M, Coith, C, Kluth, LA, Ahyai, SA: Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: a prospective study. *European urology*, 61: 810-817, 2012.
84. Kiss, B, Wyatt, AW, Douglas, J, Skuginna, V, Mo, F, Anderson, S, Rotzer, D, Fleischmann, A, Genitsch, V, Hayashi, T: Her2 alterations in muscle-invasive bladder cancer: Patient selection beyond protein expression for targeted therapy. *Scientific Reports*, 7, 2017.
85. Grivas, PD, Day, M, Hussain, M: Urothelial carcinomas: a focus on human epidermal receptors signaling. *Am J Transl Res*, 3: 362-373, 2011.
86. Dadhania, V, Zhang, M, Zhang, L, Bondaruk, J, Majewski, T, Siefker-Radtke, A, Guo, CC, Dinney, C, Cogdell, DE, Zhang, S: Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. *EBioMedicine*, 12: 105-117, 2016.
87. Gomez-Martin, C, Plaza, JC, Pazo-Cid, R, Salud, A, Pons, F, Fonseca, P, Leon, A, Alsina, M, Visa, L, Rivera, F, Galan, MC, Valle, Ed, Vilardell, F, Iglesias, M, Fernandez, S, Landolfi, S, Cuatrecasas, M, Mayorga, M, Paulés, MJ, Sanz-Moncasi, P, Montagut, C, Garralda, E, Rojo, F, Hidalgo, M, Lopez-Rios, F: Level of HER2 Gene Amplification Predicts Response and Overall Survival in HER2-Positive Advanced Gastric Cancer Treated With Trastuzumab. *Journal of Clinical Oncology*, 31: 4445-4452, 2013.
88. Bang, Y-J, Van Cutsem, E, Feyereislova, A, Chung, HC, Shen, L, Sawaki, A, Lordick, F, Ohtsu, A, Omuro, Y, Satoh, T: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, 376: 687-697, 2010.
89. Wezel, F, Erben, P, Gaiser, T, Budjan, J, von Hardenberg, J, Michel, MS, Bolenz, C: Complete and durable remission of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic urothelial carcinoma following third-line treatment with trastuzumab and gemcitabine. *Urologia internationalis*, 2016.
90. Hussain, MH, MacVicar, GR, Petrylak, DP, Dunn, RL, Vaishampayan, U, Lara Jr, PN, Chatta, GS, Nanus, DM, Glode, LM, Trump, DL: Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: Results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 2218-2224, 2007.
91. Narayan, V, Mamtani, R, Keefe, S, Guzzo, T, Malkowicz, SB, Vaughn, DJ: Cisplatin, gemcitabine, and lapatinib as neoadjuvant therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, 48: 1084, 2016.
92. Groenendijk, FH, de Jong, J, van de Putte, EEF, Michaut, M, Schlicker, A, Peters, D, Velds, A, Nieuwland, M, van den Heuvel, MM, Kerkhoven, RM: ERBB2 mutations characterize a subgroup of muscle-invasive bladder cancers with excellent response to neoadjuvant chemotherapy. *European urology*, 69: 384-388, 2016.
93. Ross, JS, Wang, K, Gay, LM, Al-Rohil, RN, Nazeer, T, Sheehan, CE, Jennings, TA, Otto, GA, Donahue, A, He, J: A high frequency of activating extracellular

- domain ERBB2 (HER2) mutation in micropapillary urothelial carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20: 68-75, 2014.
94. Choudhury, NJ, Campanile, A, Antic, T, Yap, KL, Fitzpatrick, CA, Wade III, JL, Karrison, T, Stadler, WM, Nakamura, Y, O'Donnell, PH: Afatinib activity in platinum-refractory metastatic urothelial carcinoma in patients with ERBB alterations. *Journal of Clinical Oncology*, 34: 2165-2171, 2016.
95. Allen, CA, Payne, SL, Harville, M, Cohen, N, Russell, KE: Validation of Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays for Measuring Cytokine Expression in Equine Macrophages. *Journal of immunological methods*, 328: 59-69, 2007.
96. Demes, M, Bartsch, H, Scheil-Bertram, S, Mücke, R, Fisseler-Eckhoff, A: Real-time PCR data processing shown by the analysis of colorectal specific candidate genes, ERCC1, RRM1 and TS in relation to β 2M as endogenous control. *Applied Sciences*, 2: 139-159, 2012.
97. Gjerdrum, LM, Sorensen, BS, Kjeldsen, E, Sorensen, FB, Nexø, E, Hamilton-Dutoit, S: Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 6: 42-51, 2004.
98. Von Ahlfen, S, Missel, A, Bendrat, K, Schlumpberger, M: Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PloS one*, 2: e1261, 2007.
99. Stanta, G, Mucelli, SP, Petrera, F, Bonin, S, Bussolati, G: A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*, 15: 115-123, 2006.
100. Tricarico, C, Pinzani, P, Bianchi, S, Paglierani, M, Distante, V, Pazzagli, M, Bustin, SA, Orlando, C: Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical biochemistry*, 309: 293-300, 2002.
101. Masood, S: Raising the bar: a plea for standardization and quality improvement in the practice of breast pathology. *The breast journal*, 12: 409-412, 2006.
102. Müller, M, Cross, N, Erben, P, Schenk, T, Hanfstein, B, Ernst, T, Hehlmann, R, Branford, S, Saglio, G, Hochhaus, A: Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*, 23: 1957-1963, 2009.
103. Branford, S, Fletcher, L, Cross, NC, Müller, MC, Hochhaus, A, Kim, D-W, Radich, JP, Saglio, G, Pane, F, Kamel-Reid, S: Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*, 112: 3330-3338, 2008.
104. Cuadros, M, Talavera, P, López, F, Garcia-Perez, I, Blanco, A, Concha, A: Real-time RT-PCR analysis for evaluating the Her2/neu status in breast cancer. *Pathobiology*, 77: 38-45, 2010.
105. Wolff, AC, Hammond, MEH, Hicks, DG, Dowsett, M, McShane, LM, Allison, KH, Allred, DC, Bartlett, JM, Bilous, M, Fitzgibbons, P: Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology*, 31: 3997-4013, 2013.
106. Bellmunt, J, Werner, L, Bamias, A, Fay, AP, Park, RS, Riestter, M, Selvarajah, S, Barletta, JA, Berman, DM, Muga, S: HER2 as a target in invasive urothelial carcinoma. *Cancer medicine*, 4: 844-852, 2015.

107. Simonetti, S, Russo, R, Ciancia, G, Altieri, V, De Rosa, G, Insabato, L: Role of polysomy 17 in transitional cell carcinoma of the bladder: immunohistochemical study of HER2/neu expression and fish analysis of c-erbB-2 gene and chromosome 17. *International journal of surgical pathology*, 17: 198-205, 2009.
108. Caner, V, Turk, NS, Duzcan, F, Tufan, NLS, Kelten, EC, Zencir, S, Dodurga, Y, Bagci, H, Duzcan, SE: No strong association between HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in high-grade invasive urothelial carcinomas. *Pathology & Oncology Research*, 14: 261-266, 2008.
109. Schlemmer, BO, Sorensen, B, Overgaard, J, Olsen, K, Gjerdrum, L, Nexø, E: Quantitative PCR—new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 64: 511-522, 2004.
110. de Cremoux, P, Martin, EC, Vincent-Salomon, A, Dieras, V, Barbaroux, C, Liva, S, Pouillart, P, Sastre-Garau, X, Magdelenat, H: Quantitative PCR analysis of c-erb B-2 (HER2/neu) gene amplification and comparison with p185HER2/neu protein expression in breast cancer drill biopsies. *International journal of cancer*, 83: 157-161, 1999.
111. Junttila, TT, Laato, M, Vahlberg, T, Söderström, K-O, Visakorpi, T, Isola, J, Elenius, K: Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms. *Clinical Cancer Research*, 9: 5346-5357, 2003.
112. Barberis, M, Pellegrini, C, Cannone, M, Arizzi, C, Coggi, G, Bosari, S: Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer: a technical and cost-effectiveness analysis. *American journal of clinical pathology*, 129: 563-570, 2008.
113. Rigby, CC, Franks, L: A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *British journal of cancer*, 24: 746, 1970.
114. O'Toole, CM, Povey, S, Hepburn, P, Franks, LM: Identity of some human bladder cancer cell lines. *Nature*, 301: 429-430, 1983.
115. Bubenik, J, Baresova, M, Viklicky, V, Jakoubkova, J, Sainerova, H, Donner, J: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer*, 11: 765-773, 1973.
116. Grossman, H, Wedemeyer, G, Ren, L, Wilson, G, Cox, B: Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *The Journal of urology*, 136: 953-959, 1986.
117. Petzoldt, JL, Leigh, IM, Duffy, PG, Sexton, C, Masters, JRW: Immortalisation of human urothelial cells. *Urological Research*, 23: 377-380, 1995.

7 TABELLARISCHER ANHANG

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Geräte	Hersteller
Electrophorese Power Supplyer Consort	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Gefrierschrank -80°C,	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gelsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Inkubator	Binder, Tuttlingen, Österreich
Kühlschrank -4°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Minispin-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Minizentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Molecular Imager GelDoc XR+	BioRad, Hercules, U.S.A.
Pipetten 1, 2, 10, 100, 200, 1000 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten 1, 2, 10, 100, 200, 1000 ml	Gilson, Middleton, U.S.A.
Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat R	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
StepOne Plus RT-PCR System	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermoshaker	Grant Instruments, Cambridge, GB
Verwirbler (Vortexer)	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

7.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 10: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
----------	------------

Eisbehälter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalhandschuhe	Sempermed, Singapore
OP-Mundschutz	Seidel Medipool, Gauting-Buchendorf, Deutschland
Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Optical Adhesive Film	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Optical Adhesive Film Applicator	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, U.S.A.
Pipettenspitze 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland & Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serological Pipet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vernichtungsbeutel	LLG Labware, Meckenheim, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon	Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.

7.1.3 Kits und Chemikalien

Tabelle 11: Kits und Chemikalien

Chemikalie/Kit	Hersteller
0,1 M Dithiotreitol	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
10 mM dNTP Mix	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Alkopharm 80 Oberflächendesinfektion	Brüggemann, Heilbronn, Deutschland
Aqua ad inject.	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's medium	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Fast SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Fast Universal Master Mix	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glutamin 200 mM	
Lyogney-Broth-Kulturmedium	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.

LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
McCoy's Kulturmedium	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Midori Green Direct	Nippon Genetics, Tokio, Japan
M-MLV RT 5x Strand Puffer	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Promega, Mannheim, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
pdN6 Random Primer	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Quick Load 1 kb DNA Ladder	BioLabs, Ipswich, U.S.A.
RNAse OUT	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNA XTRAKT Kit	Stratifyer, Köln, Deutschland
Rosswell Park Memorial Institute Medium	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Super Optimal Broth Catabolite Medium	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,25 %	Thermo Fisher, Waltham, U.S.A.

7.1.4 Zelllinien

Die in dieser Arbeit genutzten Zelllinien waren allesamt Urothelkarzinom-Zelllinien.

Tabelle 12: Zelllinien

Zelllinie	Tumorgrad	Geschlecht des Spenders	Referenz
RT 4	T2, G1, behandeltes Rezidiv	Männlich	Rigby, Franks, 1967 ¹¹³
RT112	G2, Primärtumor, papillär, behandelt	Weiblich	O'Toole, Povey et al., 1983 ¹¹⁴
T24	G3, Primärtumor, unbehandelt	Weiblich	Bubenik et al., 1973 ¹¹⁵
UM-UC 3	n.a.	n.a.	Grossman et al., 1982 ¹¹⁶
Urotsa	Urether, non-maligne	Weiblich	Petzold et al., 1995 ¹¹⁷

7.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 13: Oligonukleotide

Name	Sequenz	Anzahl Nukleotide	Beschreibung
MP501_P	5'-TCGCGTCTCGGAAACCGGTAGC-3'	22	Calm Sonde
MP501_For	5'-GAGCGAGCTGAGTGGTTGTG-3'	20	Calm Forward Primer
MP501_Rev	5'-AGTCAGTTGGTCAGCCATGCT-3' (5'-3' auf dem kompl. Strang)	21	Calm Reverse Primer
Her2_26For	5'-GTGGAGTTATGGTGTGACTGTG-3'	22	Her2 Forward Primer
Her2_27Rev	5'-TTTCCAGCAGGTCAGGGATC-3' (5'-3' auf dem kompl. Strang)	20	Her2 Reverse Primer
Her2_27P	5'-GAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGA-3'	32	Her2 Sonde
ENF1102M	5'-GAAAATAYRTGGTTGGAGAGCTCATT-3'	26	Gus Forward Primer
ENR1162	5'-CCGAGTGAAGATGGGGTTTTTA-3'	22	Gus Reverse Primer
ENPr1142	5'-CCAGCACTCTCGTCGGTGAAGTGTTC-3'	26	Gus Sonde

Die in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 100pmol/ μ l verdünnt und bei -20 °C gelagert. Hersteller aller genutzten Oligonukleotide war die Firma Eurofins, Luxemburg.

7.1.6 Plasmide

Der pCR 4-TOPO Vektor® ist ein 4 kbp großes Plasmid, welches zur Insertion von DNA-Zielprodukten und deren Klonierung genutzt werden kann. Die Insertionsregion befindet sich auf einem LacZ α -ccdB-Fusionsgen innerhalb des Vektors. Zu Selektions- und Identifikationszwecken umfasst das Plasmid ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen. (Abb. 16)

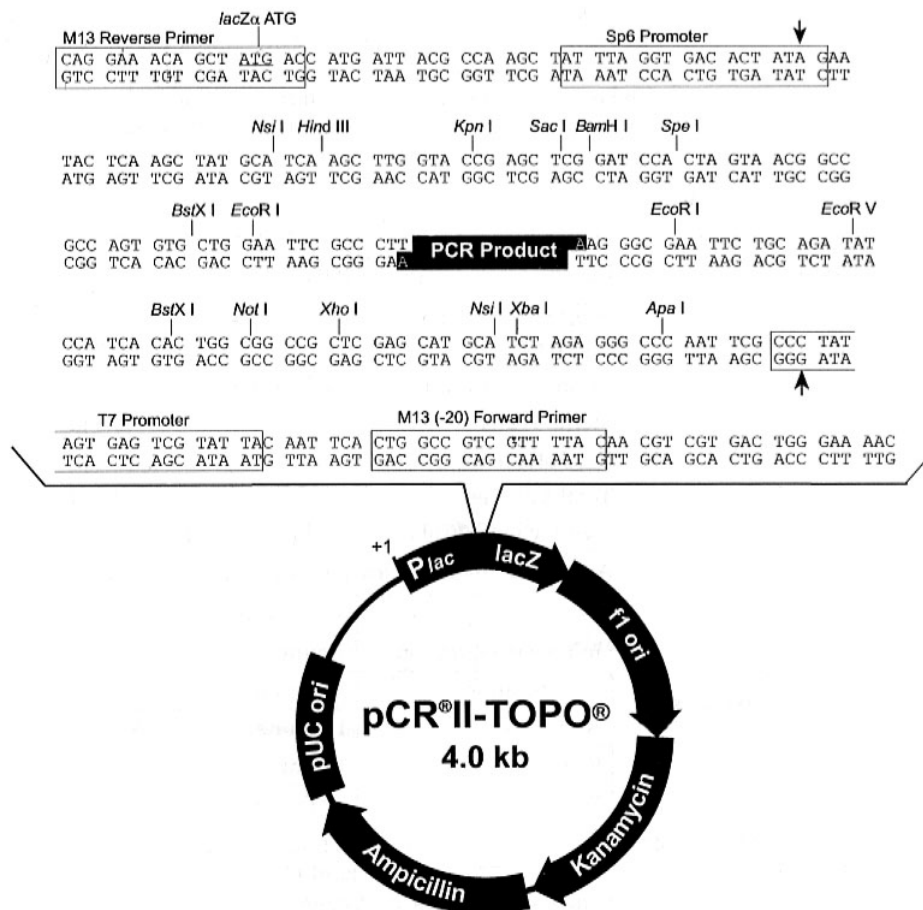


Abbildung 16: Schematische Vektor-Map des pCR-TOPO-Vektors®, der für die Klonierung der PCR-Standards genutzt wurde.

7.2 Publikationen

Aus dieser Arbeit ist folgende Publikation hervorgegangen:

Erben, P, Wezel, F, Wirtz, R, Martini, T, Stein, D, Weis, C-A, Hartmann, A, Bolenz, C: Bedeutung der ERBB-Rezeptorfamilie beim Urothelkarzinom der Harnblase: mRNA-Expression und prognostische Relevanz. *Aktuelle Urologie*, 48: 356-362, 2017.

7.3 Weitere Abbildungen und Tabellen

Abb. 17 zeigt die Korrelation der nicht-normalisierten Ct-Werte der Messreihen „Mannheim PCR“ und „Mannheim Extraktion und PCR“. Durch die Normalisierung konnte der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient von 0,42 auf 0,62 (Abb. 13) gesteigert werden.

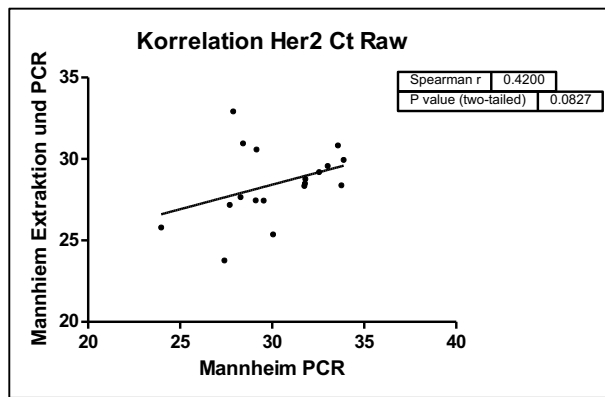


Abbildung 17: Korrelationsdiagramm der Messreihen „Mannheim Extraktion und PCR“ und „Mannheim PCR“ für Her2 als nicht-normalisierte Roh-Ct-Werte. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient liegt bei 0,42. $p = 0,08$

Abb. 18 zeigt die Korrelation der nicht-normalisierten Ct-Werte der Messreihen „Mannheim PCR“ und „Köln Extraktion und PCR“. Durch die Normalisierung konnte der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient von 0,36 auf 0,51 (Abb. 15) gesteigert werden.

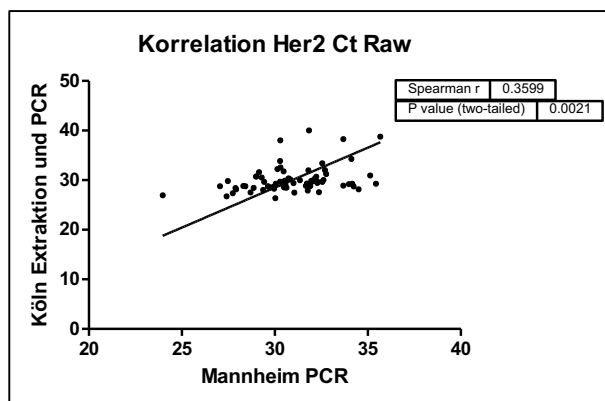


Abbildung 18: Korrelationsdiagramm der Messreihen „Köln Extraktion und PCR“ und „Mannheim PCR“ für Her2 als nicht-normalisierte Roh-Ct-Werte. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient liegt bei 0,36. $p = 0,0021$

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Stein, Doron Benjamin.....
Geburtsdatum: 12. Juli 1991.....
Geburtsort: Bonn.....
Familienstand: ledig.....
Vater: Dr. Bernd-Jürgen Stein.....
Mutter: Heide Lore Hermine Weimer-Stein.....

SCHULISCHER WERDEGANG

(1996) – (2000) Till-Eugenspiegel-Schule Bonn
(2000) – (2010) Beethoven-Gymnasium Bonn
(25. Juni 2010) Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2010/2011 Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
(September 2012) Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
(2012) – (2018) Hauptstudium, Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
(2013) – (2017) Studium der Gesundheitsökonomie, Mannheim Institute of Public Health

9 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn PD Dr. Philipp Erben, Herrn Prof. Christian Bolenz und Herrn Dr. Thomas Martini für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Philipp Erben für die durchweg intensive Betreuung, seine stete Unterstützung und die vielen Hilfestellungen.

Besonderen Dank schulde ich ebenso Herrn Dr. Christian Wirtz vom Partnerlabor Stratifyer in Köln für die Überlassung der Referenzdaten, welche diese Arbeit maßgeblich bereichert haben.

Ebenso danke ich Frau Dr. Katja Nitschke für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Mridul Agrawal und Herrn Julian Friedrich, die sich in langen Gesprächen und intensiven Diskussionen mit offenem Ohr meinen Zweifeln gestellt und auch inhaltlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Christian Sell danke ich für seinen Einsatz bei der formalen Prüfung des Skriptums.

Zuletzt möchte ich ein besonderes Dankeschön an Frau Annette Steidler aussprechen. Ohne ihre Geduld und Beständigkeit beim Lehren der praktischen Anwendung der in dieser Arbeit genutzten Labormethoden wäre diese Arbeit und die vieler anderer Doktoranden nicht möglich.