

Aus der Klinik für Urologie und Urochirurgie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel)

Genexpression molekularer Zielstrukturen im gepaarten Primärtumor,  
invasiven Tumor und Metastase beim Harnblasenkarzinom

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

vorgelegt von  
Christopher Böhmer  
geboren in Mainz

im November 2019

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

# Inhaltsverzeichnis

|   | Seite     |
|---|-----------|
| <b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>                                 | <b>1</b>  |
| <b><u>1 EINLEITUNG</u></b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase</b>                        | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Epidemiologie   | 1         |
| 1.1.2 Ätiologie   | 2         |
| 1.1.3 Klinik und Diagnostik   | 2         |
| 1.1.4 Tumorklassifikation   | 3         |
| 1.1.5 Therapie  | 5         |
| <b>1.2 Molekularbiologische Klassifikation des Urothelkarzinoms</b> | <b>6</b>  |
| 1.2.1 Grundlagen und Analogie zum Mammakarzinom                     | 6         |
| 1.2.2 Die Marker im Einzelnen                                       | 8         |
| <b><u>2 FRAGESTELLUNG</u></b>                                       | <b>10</b> |
| <b><u>3 MATERIAL UND METHODEN</u></b>                               | <b>11</b> |
| <b>3.1 Patientenauswahl</b>   | <b>11</b> |
| 3.1.1 Klinische Einschlusskriterien                                 | 11        |
| 3.1.2 Vorauswahl nach Histopathologie                               | 11        |
| <b>3.2 Verarbeitung des Gewebes</b>                                 | <b>11</b> |
| 3.2.1 FFPE- Gewebeproben  | 11        |
| <b>3.3 Molekularbiologische Untersuchung</b>                        | <b>12</b> |
| 3.3.1 RNA- Isolation und cDNA- Synthese                             | 12        |
| 3.3.2 Reaktionsprinzip der Genexpressionsanalyse                    | 13        |
| <b>3.4 Mathematische Auswertung und statistische Analysen</b>       | <b>14</b> |
| <b><u>4 ERGEBNISSE</u></b>  | <b>17</b> |
| <b>4.1 Patienten</b>  | <b>17</b> |
| <b>4.2 Etablierung des Analyseverfahrens</b>                        | <b>19</b> |
| <b>4.3 Rohwerte der Genexpression aller Gewebe</b>                  | <b>20</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>4.4</b> | <b>Genexpression in Abhängigkeit verschiedener Faktoren</b>                             | <b>20</b> |
| 4.4.1      | Einfluss von Berechnung und Referenzgen auf die Genexpression                           | 20        |
| 4.4.2      | Unterschiede in der Genexpression zwischen den Präparaten                               | 21        |
| 4.4.3      | Klinisch- pathologische Einflüsse auf die Genexpression                                 | 22        |
| <b>4.5</b> | <b>Korrelation der Genexpression zwischen den Gewebeproben</b>                          | <b>24</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Überlebensanalysen</b>   | <b>26</b> |
| 4.6.1      | Gesamtüberleben abhängig von der Genexpression  | 26        |
| 4.6.2      | Progressionsfreies Überleben  | 27        |
| <b>4.7</b> | <b>Einteilung in luminale und basale Subtypen</b>                                       | <b>29</b> |
| <b>5</b>   | <b><u>DISKUSSION</u></b>  | <b>31</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Material, Methode und Auswahl der Zielgene</b>                                       | <b>31</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Genexpression in Abhängigkeit verschiedener Faktoren</b>                             | <b>33</b> |
| 5.2.1      | Konkordanz der Genexpression  | 33        |
| 5.2.2      | Überlebensanalysen  | 36        |
| <b>6</b>   | <b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>   | <b>40</b> |
| <b>7</b>   | <b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>  | <b>42</b> |
| <b>8</b>   | <b><u>ANHANG</u></b>  | <b>47</b> |
| <b>8.1</b> | <b>Einfluss von Berechnung und Referenzgen auf die Genexpression</b>                    | <b>47</b> |
| 8.1.1      | Mit Formel 1 berechnet  | 51        |
| 8.1.2      | Mit Formel 2 berechnet  | 53        |
| 8.1.3      | Unterschiede in der Genexpression zwischen den Präparaten                               | 55        |
| <b>8.2</b> | <b>Genexpression nach Geschlecht</b>  | <b>57</b> |
| <b>8.3</b> | <b>Genexpression nach T-Stadium</b>   | <b>58</b> |
| <b>8.4</b> | <b>Genexpression in Abhängigkeit des Tumoranteils des FFPE-Gewebeschnitts</b>           | <b>59</b> |
| <b>8.5</b> | <b>Einfluss der Zeitspanne zwischen TURB und CX auf die Differenz der Genexpression</b> | <b>60</b> |
| <b>8.6</b> | <b>Korrelation der Genexpression zwischen den Gewebeproben</b>                          | <b>61</b> |
| <b>8.7</b> | <b>Überlebensanalysen</b>   | <b>62</b> |
| 8.7.1      | Gesamtüberleben nach Genexpressionshöhe   | 62        |
| 8.7.2      | Progressionsfreies Überleben nach Genexpressionshöhe                                    | 64        |
| <b>9</b>   | <b><u>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</u></b>                                       | <b>66</b> |

**10** **LEBENS LAUF** **68**

---

**11** **DANKSAGUNG** **69**

---

## Abkürzungsverzeichnis

|                     |  |
|---------------------|--|
| BCG                 | Bacillus Calmette-Guérin   |
| CALM                | Calmodulin 2 Gen   |
| cDNA                | komplementäre DNA  |
| Cis                 | Carcinoma in situ  |
| Cq = C <sub>T</sub> | quantification Cycle = Schwellenwert- Zyklus (Synonym gebrauchte Bezeichnung je nach Hersteller des PCR-Geräts)        |
| CT                  | Computertomographie  |
| CX                  | Zystektomie  |
| DNA                 | Desoxyribonukleinsäure   |
| EGFR                | Epidermal growth factor receptor = Epidermaler Wachstumsfaktor- Rezeptor   |
| ERBB 2 / HER2/neu   | Gen-Name des human epidermal growth factor receptor 2  |
| ESR1                | Estrogen (Östrogen) Rezeptor 1- Gen = kodiert ER $\alpha$ - Anteil des Östrogenrezeptors                               |
| ESR2                | Estrogen (Östrogen) Rezeptor 2- Gen = kodiert ER $\beta$ - Anteil des Östrogenrezeptors                                |
| FFPE                | Formalin-fixed, paraffin-embedded (in Formalin fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe)                            |
| FISH                | Fluoreszenz in situ Hybridisierung   |
| HE                  | Hämatoxylin- Eosin   |
| HR                  | Hazard Ratio   |
| ICD-10 C67          | ICD-Code für eine bösartige Neubildung der Harnblase   |
| ICD-10 D09.0        | ICD-Code für ein Carcinoma in situ der Harnblase   |
| ICD-10 D41.4        | ICD-Code für eine Neubildung unsicheren oder unbekanntens Verhaltens der Harnblase                                     |
| ICD-10              | WHO- Klassifikation von Krankheiten (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) |
| IHC                 | Immunhistochemie   |
| KI                  | Konfidenzintervall   |

|         |  |
|---------|--|
| LK      | Lymphknoten                                      |
| MIBC    | Muskel- invasives- Blasen- Karzinom              |
| MMC     | Mitomycin  |
| mRNA    | Messenger- Ribonukleinsäure                      |
| n.s.    | nicht signifikant                                |
| NMIBC   | Nicht- Muskel- invasives- Blasen- Karzinom       |
| PCR     | Polymerase-Ketten-Reaktion                       |
| RNA     | Ribonukleinsäure                                 |
| RT-qPCR | Reverse transkription quantitative real-time PCR |
| TNM     | Tumor Nodus Metastasen- Klassifikation           |
| TURB    | Transurethrale Resektion der Blase               |
| WHO     | Weltgesundheitsorganisation                      |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Im Jahr 2012 erkrankten daran in Deutschland etwa 22.300 Männer und 7.200 Frauen.<sup>46</sup> Damit ist es der zehnthäufigste Tumor bei Frauen und der vierthäufigste bei Männern.<sup>46</sup>

Nicht- invasive Tumoren mit dem Tumorstadium pTa, Carcinoma in situ und T1 (zur Einteilung der Tumoren siehe 1.1.4) machen 70%<sup>37</sup> bis 80%<sup>56</sup> der Fälle aus. Bei jedem vierten betroffenen Mann und jeder dritten Frau wird bereits bei Diagnose ein muskelinvasives Wachstum festgestellt.<sup>46</sup>

Die Inzidenz der Erkrankung ist seit 1970 insgesamt zunehmend, was u.a. mit einer höheren Entdeckungsrate<sup>46</sup> und dem Anstieg der Erkrankungswahrscheinlichkeit im höheren Lebensalter bei steigender Lebenserwartung<sup>18</sup> zusammenhängen könnte. Seit 1990 ist bei Männern eine rückläufige Tendenz zu beobachten. Als Ursache für den Rückgang werden eine Verringerung des Tabakkonsums und eine geringere berufliche Exposition gegenüber Karzinogenen diskutiert.<sup>18, 47</sup>

Erkrankt eine Frau an der muskelinvasiven Form des Harnblasenkarzinom, beträgt ihr relatives-5-Jahres-Überleben aktuell 32,7%, bei einem Mann 40,6%.<sup>46</sup> Der Unterschied ist teilweise durch das zum Diagnosezeitpunkt durchschnittlich höhere Stadium bei Frauen zu erklären.

Bei der nicht-muskelinvasiven Form ist das 5-Jahres-Überleben für Frauen (88,1%) und Männer (87,0%) vergleichbar hoch.<sup>46</sup>

Eine zusätzliche Herausforderung stellt die Nachsorgebehandlung des Harnblasenkarzinoms dar. Die Wahrscheinlichkeit für eine Tumorprogression oder ein Rezidiv ist abhängig von der Tumorbiologie (zwischen 31% und 78% für Rezidiv eines NMIBC und 0,8% und 45% für Progression eines NMIBC innerhalb von 5 Jahren<sup>55</sup>; bis zu 15% Lokalrezidivrate beim MIBC<sup>26</sup>) und führt zu einem risikoadaptierten Vorgehen.<sup>37</sup>

Die durch invasive Blasentumoren verursachten direkten Krankheitskosten (durch Inanspruchnahme von Gesundheitsleistungen entstandenen Kosten) betragen im



Jahr 2008 etwa 582 Millionen Euro.<sup>46</sup> Dadurch ist das Harnblasenkarzinom eine der teuersten Tumorentitäten pro Fall.

### 1.1.2 Ätiologie

Im Zusammenhang mit der Entstehung eines Harnblasenkarzinoms wurden verschiedene Risikofaktoren identifiziert.

Zigarettenkonsum erhöht das Risiko eines Harnblasenkarzinoms um ein Vielfaches, je nach Dauer und Menge des Rauchens bis auf das Fünffache.<sup>6</sup>

Aromatische Amine und bestimmte Medikamente (z.B. Cyclophosphamid) stehen ebenfalls in einem gesicherten Zusammenhang mit der Entstehung von Blasenneoplasien.<sup>37</sup>

Weitere Risikofaktoren, wie z.B. chronische Blaseninfektionen und Bestrahlungen der Beckenregion (z.B. im Rahmen der Therapie des Prostatakarzinoms) werden diskutiert.

### 1.1.3 Klinik und Diagnostik

#### 1.1.3.1 Klinik

Blut im Urin ohne gleichzeitig bestehende Schmerzen oder Dysurie ist das am Häufigsten angegebene Symptom, das zur Diagnose Blasentumor führt.<sup>39</sup>

Makrohämaturie war Studien zufolge bei 68% bis 97,5% der Patienten mit Blasenkarzinom ein Symptom.<sup>37</sup> Der positiv prädiktive Wert für das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms bei schmerzloser Makrohämaturie liegt zwischen 2,6% und 8,3%.<sup>37</sup>

Bei einer Mikrohämaturie ohne begleitende Symptome (wie z.B. Schmerzen) findet sich bei 10 bis 15 % der Patienten ein Malignom der Harnblase oder der ableitenden Harnwege.<sup>37</sup>

Weitere, mit Harnblasentumoren assoziierte Symptome, sind eher unspezifisch. Dazu gehören z.B. Dysurie und weitere Zeichen einer Harnwegsinfektion, die bei vielen Fällen zum Diagnosezeitpunkt ebenfalls vorliegt.<sup>51</sup>

### 1.1.3.2 Diagnostik

Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom wird nach weniger invasiven Maßnahmen (Urinzytologie, Sonographie, etc.) in der Regel zunächst eine Zystoskopie durchgeführt. Bei weiterhin bestehendem Verdacht auf ein Karzinom schließt sich eine transurethrale Resektion an, bei der erstmals Gewebeproben für histologische Untersuchungen gewonnen werden. Bei nicht- muskelinvasiven Blasentumoren stellt die Resektion des Tumors zudem ein zentrales Element der Therapie dar.

Im Fall eines muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms wird anschließend als Staging-Untersuchung eine Computertomographie des Throax, Abdomen und Becken mit CT- Urographie durchgeführt.<sup>37</sup>

### 1.1.4 Tumorklassifikation

Die standardisierte Einteilung des Tumors anhand der radiologischen und im Verlauf auch der histopathologischen Untersuchungen stellt eine wichtige Entscheidungsgrundlage für die spätere Therapie dar.

Dabei wird der Tumor anhand seiner Ausbreitung (Staging), seines zellulären Ursprungsgewebes (Typing) sowie seines Differenzierungsgrades (Grading) beschrieben.

#### 1.1.4.1 Staging

Das Staging erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation.<sup>37</sup> Dabei wird mit T die Ausbreitung des Tumors beschrieben, wobei vor allem zwei Gruppen unterschieden werden:

nicht muskelinvasive Harnblasenkarzinome (Ta, Tis und T1)

und

muskelinvasive Harnblasenkarzinome (ab Stadium T2).

Beim Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen wird zwischen einem betroffenen (N1), mehreren betroffenen (N2) im Bereich des Beckens und solchen entlang der Arteria iliaca communis (N3) eingeteilt.

Fernmetastasen werden mit M1 klassifiziert.

#### 1.1.4.2 Histopathologische Klassifikation

Mit etwa 95% ist das Urothelkarzinom der häufigste histopathologische Typ des Harnblasenkarzinoms.<sup>19</sup> Nichturotheliale Primärtumoren können sich beispielsweise als Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom oder andere, noch seltenere Formen darstellen.

Die Gruppe der Urothelkarzinome ist nicht homogen, es finden sich häufig weitere Differenzierungskomponenten. Deshalb schlägt die WHO die weitere Unterteilung der Urothelkarzinome in mehrere Differenzierungsformen vor.<sup>28</sup> Eine teilweise plattenepitheliale Differenzierung wird dabei am Häufigsten (in bis zu 60% der Fälle) diagnostiziert.<sup>33</sup>

Zur Einteilung werden dabei in der Regel immunhistochemische Verfahren genutzt.

Die Varianten des Urothelkarzinoms zeigen zum Teil sehr unterschiedliches Verhalten. Besonders aggressives Wachstum mit schneller Metastasierung nach Zystektomie wird für plazmazytoid oder mikropapilläre Formen beschrieben.<sup>13, 54</sup> Beim Ansprechen auf Chemotherapien lassen sich ebenfalls Unterschiede beobachten.<sup>13</sup> Daraus resultieren Unterschiede im Überleben (z.B. medianes Gesamtüberleben des mikropapillären vs. „konventionellen“ Urothelkarzinoms 44,7 vs. 91,9 Monate  $p < 0,001$ )<sup>54</sup>, was sich in den verschiedenen Behandlungsstrategien für die verschiedenen Untergruppen widerspiegelt.

Zusätzlich wird der Differenzierungsgrad der Tumorzellen (Grade) beschrieben.

Seit 2004 ist von der WHO eine Einteilung in High- Grade- und Low- Grade-Tumoren vorgeschlagen, in vielen Fällen erfolgt die Zuordnung zusätzlich in die „traditionellen“ Gruppen G1 bis G3. Mehr als 95% der muskelinvasiven Blasenkarzinome werden als high grade eingestuft.<sup>28</sup> Dies ist mit einem höheren Rezidivrisiko und schlechterer Prognose im Vergleich zu den low- grade Tumoren vergesellschaftet.<sup>46</sup>

Die histopathologische Einteilung der Tumoren und die damit verbundene Einschätzung des individuellen Risikos ist aktuell der wichtigste Parameter für die Therapieplanung.<sup>37</sup>

### 1.1.5 Therapie

Während beim nicht- muskelinvasiven Urothelkarzinom der operative Teil der Behandlung durch die TUR-B erfolgt, ist die Therapie des muskelinvasiven Tumors aufwändiger.

Das operative Standardvorgehen ist die radikale Zystektomie. Dabei werden neben der Harnblase das perivesikale Fett, das viszerale Peritoneum sowie die pelvinen Lymphknoten entfernt; beim Mann zusätzlich Prostata und Samenblase, bei der Frau Uterus, Adnexe und vordere Vaginalwand .<sup>4</sup>

Die Harnableitung kann nach der Operation entweder als inkontinente Ableitung mittels Ileum- bzw. Kolon-Konduit oder Ureterokutaneostomie oder als kontinente Ableitung mit Anlage eines katheterisierbaren Pouch, einer Neoblase oder durch Ureterosigmoideostomie gewährleistet werden.

In der Regel wird in einer interdisziplinären Tumorkonferenz über die individuelle Behandlung entschieden, um beispielsweise eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie einzuleiten. Im Fall von organüberschreitendem muskelinvasiven Wachstum ( $\geq pT3$ ) oder beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (pN+) ist dies in der Regel eine cisplatinhaltige Kombinationschemotherapie.<sup>37</sup>

Die langfristige Lebensqualität des Patienten wird im Anschluss beispielsweise durch die Art der alternativen Harnableitung und der damit einhergehenden Einschränkung der Kontinenz beeinflusst. Abhängig vom Operationsverfahren ist auch die Sexualfunktion beeinträchtigt. Die sogenannte „Progredienzangst“,<sup>46</sup> also die Angst des Patienten vor einem Rezidiv oder dem Fortschreiten der Erkrankung, ist für die Nachsorge ebenfalls ein wichtiger Faktor.

In der Vergangenheit wurden, beispielsweise durch Studien mit zielgerichteten Therapien, große Bemühungen unternommen die Behandlungsergebnisse zu optimieren. Allerdings konnte in den letzten zwei Jahrzehnten keine signifikante Verbesserung der Überlebensraten beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom erzielt werden.<sup>10</sup>

## 1.2 Molekularbiologische Klassifikation des Urothelkarzinoms

### 1.2.1 Grundlagen und Analogie zum Mammakarzinom

Bereits morphologisch fällt beim Urothelkarzinom durch verschiedene Wachstumsmuster die Heterogenität der Erkrankung auf. Durch histopathologische Analysen bestätigt sich diese Annahme.<sup>56</sup>

Eine diskutierte Erklärung für diese Beobachtung ist die mögliche „Abstammung“ der Tumorzellen aus einer der verschiedenen Differenzierungsstadien des Urothels. Diese Theorie wird durch die in den Tumoren unterschiedliche Expression von für die luminalen bzw. basalen Urothelzellen typischen Marker gestützt.<sup>11</sup> Allerdings ist auch eine „basal-luminale-Plastizität“ in den luminalen Tumoren beschrieben, sodass hier weitere Forschung zur Erklärung stattfindet.<sup>11</sup>

Daher wurde neben der histopathologischen Einteilung (siehe 1.1.4.2) molekulare Subklassifikationen etabliert, die den verschiedenen Tumorentitäten Rechnung tragen.

Mit Hilfe genomweiter Expressionsanalysen konnten im Jahr 2014 drei Arbeitsgruppen<sup>9, 12, 16</sup> für das Urothelkarzinom Untergruppen identifizieren, die auch Einfluss auf das Ansprechen auf chirurgische und chemotherapeutische Behandlungen<sup>12</sup> sowie die Prognose<sup>16</sup> des Patienten haben.

Die verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten unterschiedliche Einteilungen und definierten zwischen zwei und fünf Subtypen, teils noch mit weiteren Unterteilungen versehen. Um die Gruppen zu vergleichen, wurden einige der jeweiligen Kriterien auf die anderen Kohorten angewandt und es zeigten sich große Übereinstimmungen.<sup>11, 40</sup> So kommt beispielsweise in allen Einteilungen eine Gruppe der basalen Tumoren vor. Je nach Definition unterscheiden sich die prozentualen Anteile der Subtypen an der Gesamtheit der Tumoren und teilweise kommt es zu Überschneidungen.

Eine Übersicht zeigt Abbildung 1.

Bemerkenswert ist die Analogie der Einteilung mit der des Mammakarzinoms. Es konnte gezeigt werden, dass die molekularbiologischen Kriterien, nach denen sich das Mammakarzinom in Untergruppen einteilen lässt, auch beim Urothelkarzinom eine Einteilung zulassen.<sup>16</sup> Auch einzelne Eigenschaften der Untergruppen der beiden Tumoren scheinen vergleichbar.<sup>40</sup>

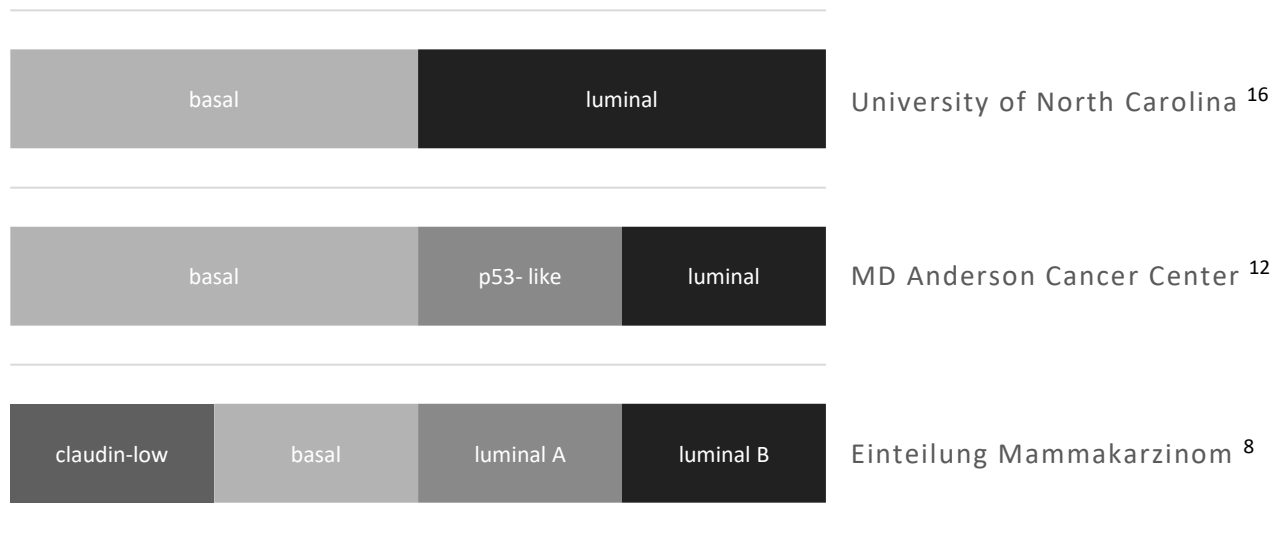


Abbildung 1: **Vergleich verschiedener Einteilungsmodelle des Urothelkarzinoms** von unterschiedlichen Arbeitsgruppen und Gegenüberstellung mit der Einteilung für Brustkrebs. Adaptiert nach 27

Die basalen Tumoren fielen beispielsweise durch höhere Aggressivität und zum Diagnosezeitpunkt höhere TNM- Stadien auf. Außerdem war das krankheitsspezifische und das Gesamtüberleben schlechter als in der Gruppe der luminalen Tumoren. Diese Eigenschaften teilen die basalen Urothelkarzinome mit den basalen Mammatumoren. Zudem scheint dieser Urothelkarzinomtyp häufiger bei Frauen vorzukommen.<sup>11, 40</sup> Darüber hinaus konnten auch Unterschiede beim Ansprechen auf Chemotherapien gezeigt werden: während ein großer Teil der basalen Tumoren durch eine neoadjuvante Chemotherapie positiv beeinflusst werden konnte, zeigten sich Tumoren der p53-like- Gruppe chemotherapieresistent.<sup>40</sup>

2017 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe des Cancer Genome Atlas- Projekts die Aktualisierung und Vertiefung der Subgruppeneinteilung.<sup>48</sup> Darin wurden die luminalen Tumoren weiter in luminal-papillär, luminal-infiltrierend und luminal unterschieden. Eine zusätzliche Gruppe bildeten die neuronalen Tumoren. Den verschiedenen Entitäten konnten jeweils auch klinische und prognostische Eigenschaften zugeordnet werden, beispielsweise zeigte die Gruppe der neuronal differenzierten Urothelkarzinome das schlechteste Überleben.

## 1.2.2 Die Marker im Einzelnen

Um Urothelkarzinome in verschiedene molekulare Subgruppen einzuteilen, stehen mehrere molekulare Biomarker zur Verfügung.<sup>11</sup> Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten sollen hier kurz charakterisiert werden:

### 1.2.2.1 Zytokeratin 5 und Zytokeratin 20

Die Familie der Zytokeratine umfasst 20 verschiedene Proteine, die als Intermediärfilamente einen wichtigen Teil des Zytoskeletts epithelialer Zellen darstellen. Die Verteilung der Zytokeratine ist gewebespezifisch, wodurch sie beispielsweise bei der Suche nach dem Primarius einer Tumormetastase diagnostische Bedeutung erlangen.<sup>42, 45</sup>

In Urothelgewebe und Urothelkarzinomen sind unter anderem Zytokeratin 5 und Zytokeratin 20 nachweisbar, physiologisch wird Zytokeratin 5 von Basalzellen und Zytokeratin 20 vor allem von den Deckzellen exprimiert.<sup>42, 45</sup>

Dies spiegelt sich auch in der Einteilung des Urothelkarzinoms in die Subtypen wider: Keratin 5 als Biomarker für die basale, Keratin 20 für die luminale Subgruppe.<sup>9, 11, 12, 16, 40, 48</sup>

### 1.2.2.2 Östrogenrezeptoren

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede beim Blasenkarzinom waren Anlass für zahlreiche Untersuchungen, auch im Hinblick auf die Geschlechtshormone und deren Rezeptoren. Die Östrogenrezeptoren gehören zur Familie der nukleären Steroidrezeptoren. Diese regulieren nach Aktivierung durch das jeweilige Hormon als Transkriptionsfaktor die Genexpression direkt im Kern der Zelle.<sup>50</sup>

Zwei Subtypen des Östrogenrezeptors sind bekannt (ESR1 und ESR2). Die Ergebnisse von Studien zur Rolle des Rezeptors und seiner Subtypen beim Blasenkarzinom brachten, teils unter anderem auch abhängig von der Analyseart (immunhistochemisch versus PCR-basiert), widersprüchliche Ergebnisse.<sup>24, 27</sup> Auch eine Änderung des Expressionsprofils der Rezeptortypen während des Wachstums eines Blasentumors (auf dem „Weg“ vom nicht-invasivem zum invasiven Urothelkarzinom) wird diskutiert.<sup>7</sup>

Genexpressionsanalysen legen nahe, dass Östrogenrezeptoren vor allem beim luminalen<sup>12, 16</sup> Subtyp des Urothelkarzinoms exprimiert sind.

Erste Studien erforschen den Nutzen von für Mammatumoren entwickelte Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen für Patienten mit Urothelkarzinom.<sup>24</sup>

### 1.2.2.3 Humaner epidermaler Wachstumsfaktor- Rezeptor HER2/neu

Der Tyrosinkinase- Rezeptor Her2/neu gehört zur Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFR). Nach Aktivierung leiten diese Rezeptoren Wachstumssignale an den Zellkern weiter und beschleunigen die Zellproliferation. Bei Aberrationen kann dieser Prozess unkontrolliert ablaufen und somit die Zellproliferation massiv verstärken.<sup>21</sup>

Durch die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers (Trastuzumab) für die Behandlung von Brusttumoren, der das Wachstum der Tumorzellen durch die Blockade des Her2/neu- Rezeptors hemmt, erlangte der Rezeptor als potentieller Ansatzpunkt für eine Therapie eine wichtige Bedeutung.<sup>11</sup>

Die Überexpression von Her2/neu beim Urothelkarzinom wurde bereits in den frühen neunziger Jahren beschrieben.<sup>14</sup> Ein Zusammenhang mit der Rezidivwahrscheinlichkeit, der Prognose und der Mortalität wird in mehreren Studien hergestellt, auch wenn der Nutzen zur Prognoseabschätzung umstritten ist.<sup>10, 43, 53, 61</sup> Aktuell wird in mehreren klinischen Studien der Nutzen von ERBB 2- Inhibitoren beim Blasenkarzinom getestet.<sup>10, 44</sup>



## 2 Fragestellung

Im Laufe der Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms stehen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Gewebeproben für eine Analyse zur Verfügung. Die Diagnose wird meist anhand von TUR-B Gewebeproben gestellt, nach einer Zystektomie können der Tumor und im Fall von Lymphknotenmetastasen die Lymphknoten zur Analyse genutzt werden.

Die Einteilung molekularer Subgruppen und die Identifizierung möglicher Zielstrukturen kann aus diesen drei Geweben erfolgen, um die Prognose des Patienten abzuschätzen oder das Ansprechen auf eine systemische Therapie zu erkennen.

Dabei ist die Eignung der Gewebe zu diesem Zweck unklar.

Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Ist eine hohe Konkordanz der Expression der Biomarker zwischen den einzelnen Geweben gegeben?
2. Korrelieren die Ergebnisse des Primarius und der Lymphknotenmetastase mit den bei der TURB gewonnenen Gewebeproben?
3. Gibt es geschlechts-, krankheits- oder überlebensspezifische Unterschiede je nach Genexpressionsmuster?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientenauswahl

#### 3.1.1 Klinische Einschlusskriterien

In die vorliegende, retrospektive Untersuchung wurden Patienten eingeschlossen, die zwischen 1998 und 2014 mit der Diagnose Urothelkarzinom in der Klinik für Urologie und Urochirurgie der Universitätsmedizin Mannheim mit einer radikalen Zystektomie behandelt worden sind.

Das Tumorstadium nach der OP musste als mindestens pT2, pN2 eingeordnet werden.

Ein entsprechender Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg genehmigt (2013-834R-MA).

#### 3.1.2 Vorauswahl nach Histopathologie

Von diesen Patienten wurden die histopathologischen, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte des Pathologischen Instituts Mannheim nach ihrem Tumoranteil beurteilt.

Eingeschlossen wurden Schnitte, bei denen mehr als 20% der Zellen Tumorzellen waren. Bei weniger als 20% Tumoranteil wurde zunächst der Tumorzellen enthaltende Bereich markiert und im Anschluss entschieden, ob eine Makrodissektion (siehe 3.2.1) des Tumors möglich ist.

Ausgeschlossen wurden Proben, wenn nur einzelne Tumorzellen auf dem Schnitt verteilt waren (Makrodissektion nicht möglich) oder wenn keine Tumorzellen zu finden waren.

### 3.2 Verarbeitung des Gewebes

#### 3.2.1 FFPE- Gewebeproben

Die zu den ausgewählten Schnitten gehörenden Gewebeproben wurden vom Pathologischen Institut der Universitätsmedizin Mannheim zur Verfügung gestellt.

Um die Konkordanz der ermittelten Genexpressionsprofile vergleichen zu können, musste von jedem Patienten mindestens ein Gewebepblock des Primarius sowie eine Lymphknotenmetastase vorhanden sein. Außerdem wurden die Gewebepblöcke der

TUR-B mit in die Analysen eingeschlossen, soweit sie durch die Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim beurteilt worden sind.

Zunächst wurden von den Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben mehrere 3µm- Schnitte angefertigt, von denen einer mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt wurde. Anschließend wurden mehrere 10µm-Schnitte auf Objektträger gebracht und 10µm Schnitte zur Weiterverarbeitung in Reaktionsgefäßen gesichert.

Mit Hilfe des HE- gefärbten Schnittes wurde der Gewebeanteil des Tumors nochmals geprüft.

Die Gewebeproben mit einem Tumoranteil von mindestens 20% konnten direkt als ganzer Schnitt weiterverarbeitet werden. Bei einem geringeren Tumoranteil wurde der Tumor auf dem HE- Schnitt markiert und anschließend der korrespondierende Anteil von einem der 10µm Schnitte isoliert (Makrodissektion).

Die Reaktionsgefäße mit den 10µm- Schnitten sowie alle Schnitte und Blöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.3 Molekularbiologische Untersuchung

#### 3.3.1 RNA- Isolation und cDNA- Synthese

Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe von RNXtract<sup>®</sup> (STRATIFYER Molecular Pathology GmbH, Köln, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers.

Dabei wurde zunächst das Paraffin geschmolzen und das Gewebe mit Hilfe von Proteinase K lysiert. Im Anschluss wurde die RNA an magnetische Partikel gebunden. In mehreren Waschschrinen wurden Kontaminationen entfernt und schließlich die RNA unter Zugabe eines „elution buffer“ wieder von den magnetischen Partikeln gelöst. Anschließend stand sie der weiteren Analyse zur Verfügung.<sup>3, 36</sup>

Bis zur weiteren Verarbeitung lagerte die RNA bei -80°C.

Das Umschreiben zur cDNA wurde mit sequenzspezifischen Primern (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland) und der reversen Transkriptase Super Script III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt (Sequenzen siehe Tabelle 1).

Das Verfahren wurde in zwei Ansätzen durchgeführt, zunächst mit den Markern ESR 1, ESR 2, CALM und RPL 37A, anschließend ERBB 2, Keratin 5, Keratin 20, CALM und RPL 37A.

Die cDNA lagerte anschließend bei -20°C.

Als Referenz diente RNA der Blasenkarzinom- Zelllinie RT112. Diese wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland extrahiert und mit random Primern und der MMLV reversen Transkriptase der Firma Thermo Scientific Fisher, Waltham, USA zu cDNA umgeschrieben.

Tabelle 1: Verwendete Primer

| Gen     | Primer | Sequenz 5'→3'               |
|---------|--------|-----------------------------|
| ESR 1   | F      | GCCAAATTGTGTTTGATGGATTAA    |
|         | R      | GACAAAACCGAGTCACATCAGTAATAG |
| ESR 2   | F      | GACAGGGATGAGGGGAAATG        |
|         | R      | TTTCCAGCAGGTCAGGGATC        |
| ERBB 2  | F      | GTGGAGTTATGGTGTGACTGTG      |
|         | R      | TTTCCAGCAGGTCAGGGATC        |
| KRT 5   | F      | CGCCACTTACCGCAAGCT          |
|         | R      | ACAGAGATGTTGACTGGTCCAATC    |
| KRT 20  | F      | GCGACTACAGTGCATATTACAGACAA  |
|         | R      | CACACCGAGCATTTCAGTT         |
| CALM    | F      | GAGCGAGCTGAGTGGTTGTG        |
|         | R      | AGTCAGTTGGTCAGCCATGCT       |
| RPL 37A | F      | TGTGGTTCCTGCATGAAGACA       |
|         | R      | GTGACAGCGGAAGTGGTATTGTAC    |

### 3.3.2 Reaktionsprinzip der Genexpressionsanalyse

Die Bestimmung des Expressionsstatus erfolgte durch quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Die Untersuchung wurde auf einem Step One™ der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA durchgeführt.

Im Einzelnen wurde der Teil der cDNA amplifiziert, der für die gesuchten Rezeptoren spezifisch ist. Dabei wurde in Echtzeit mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Hydrolysesonden (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland, Sequenzen siehe Tabelle 2) die Menge der entstehenden markerspezifischen cDNA gemessen.

In jeder Patientenprobe, sowie in der Zelllinie RT112 und dem Standard wurden folgende Marker analysiert:

Zunächst ESR 1 und ESR 2, kapazitätsbedingt in einer zweiten PCR ERBB2, Keratin 5 und Keratin 20, jeweils mit CALM und RPL als Referenzassays.

Tabelle 2: Verwendete Sonden

| Gen     | Label |      | Sequenz 5'→3'                    |
|---------|-------|------|----------------------------------|
|         | 5'    | 3'   |                                  |
| ESR 1   | FAM   | BBQ  | ATGCCCTTTTGCCGATGCA              |
| ESR 2   | FAM   | BHQ2 | CAGGAGCATGTCAAAGATTTCCAGAATTCCT  |
| ERBB 2  | FAM   | BHQ1 | GAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGA |
| KRT 5   | FAM   | BBQ  | TGGAGGGCGAGGAATGCAGACTCA         |
| KRT 20  | FAM   | BBQ  | TTGAAGAGCTGCGAAGTCAGATTAAGGATGCT |
| CALM    | VIC   | BHQ1 | TCGCGTCTCGGAAACCGGTAGC           |
| RPL 37A | FAM   | BHQ1 | TGGCTGGCGGTGCCTGGA               |

### 3.4 Mathematische Auswertung und statistische Analysen

Während der PCR wurde am Ende jedes Reaktionszyklus die Fluoreszenz gemessen.

Sie ist direkt proportional zur Menge des synthetisierten Produkts.<sup>34</sup> Der PCR-Zyklus, bei dem ein Signal über dem Hintergrundsignal detektiert wurde, wird als Schwellenwertzyklus ( $C_T$ ) bezeichnet. Jede Zielsequenz wurde zweifach bestimmt, um eine höhere Sicherheit zu gewährleisten; die weitere Rechnung wurde mit dem Mittelwert durchgeführt.<sup>34</sup>

Mit Hilfe der zwei Referenzassays wurde bestimmt, ob genügend RNA für die Analyse zur Verfügung stand. Wenn dies nicht der Fall war, konnte das Ergebnis nicht verwendet werden.

Um die Daten verschiedener PCR- Reaktionen miteinander vergleichen zu können, wurde der Mittelwert der erhobenen  $C_T$ - Werte gegen ein Referenzassay (CALM bzw. RPL) normalisiert. Damit das Ergebnis einen Zahlenwert proportional zum Genexpressionslevel annimmt, wurde  $\Delta\Delta C_T$  von der Anzahl der PCR-Zyklen (40) abgezogen.

Die Rechnung wird in der folgenden Formel verdeutlicht:

*Formel 1:*

$$\begin{aligned} 40 - \Delta\Delta C_T[\text{Zielgen}]_{\text{SAMPLE}} \\ = 40 - ((C_T\text{Mittelwert}[\text{Zielgen}]_{\text{SAMPLE}} - C_T[\text{Referenzassay}]) \\ - (C_T[\text{Zielgen}]_{\text{RT112}} - C_T[\text{Referenzassay}]_{\text{RT112}})) \end{aligned}$$

Zusätzlich wurde eine alternative Berechnungsmethode<sup>38</sup> eingesetzt, mit der die Vergleichbarkeit der Werte zusätzlich verbessert werden sollte:

*Formel 2:*

$$\begin{aligned} 2^{-\Delta\Delta C_T[\text{Zielgen}]_{\text{SAMPLE}}} \\ = 2^{-((C_T\text{Mittelwert}[\text{Zielgen}]_{\text{SAMPLE}} - C_T[\text{Referenzassay}]) - (C_T[\text{Zielgen}]_{\text{RT112}} - C_T[\text{Referenzassay}]_{\text{RT112}}))} \end{aligned}$$

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten und die Graphiken wurden mit Hilfe der Software SAS JMP 13 und GraphPad Prism 5 erstellt.

Angewandt wurden t-Tests für verbundene oder gepaarte Stichproben, beispielsweise für die Ermittlung der Unterschiede bei der Genexpression zwischen den einzelnen Gewebeproben eines Patienten. Auch unverbundene Stichproben kamen zum Einsatz, etwa beim Vergleich der Genexpression zwischen den Geschlechtern. Diese Lagetests setzen eine theoretisch normalverteilte Grundgesamtheit voraus, deren Mittelwerte miteinander verglichen werden.

Die Überlebenszeiten der verschiedenen Gruppen wurden mit dem Logrank-Test verglichen, der auf der Chi<sup>2</sup>- Verteilung basiert.

Um über die Korrelation der Expressionswerte zwischen den Geweben eine Aussage treffen zu können, wurde der Spearmans-Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser basiert auf den Rangzahlen der ermittelten Werte und wird auch als Rangkorrelation bezeichnet. Er setzt im Gegensatz zur Korrelation nach Pearson keine normalverteilten Daten voraus. Ein positiver Spearman  $\rho$ - Wert beschreibt einen gleichsinnigen, ein negatives  $\rho$  einen gegensinnigen Zusammenhang. 1 ist bei einem streng monotonen (linearen) Zusammenhang, 0 bei keinem monotonen Zusammenhang erreicht.

Um Untergruppen der Kohorte vergleichen zu können, wurde der Partitionstest eingesetzt, der dabei behilflich ist, Grenzwerte zum Teilen der Gesamtkohorte festzulegen. Dies wurde besonders im Hinblick auf Untersuchungen zum progressions- und rezidivfreien Überleben, sowie dem Gesamtüberleben genutzt. Die Trennung der Gruppen erfolgte mit Hilfe einer durch einen Partitionstest ermittelten Schwelle, die unter der jeweiligen Kaplan-Meier Kurve bzw. in den Tabellen im Anhang angegeben ist.

Bei allen Auswertungen wurden p-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patienten

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 118 Proben von 44 Patienten analysiert. Von 30 Patienten lagen die Proben aller drei Gewebe vor, bei 14 Patienten konnte das Gewebe der TURB nicht in die Analyse eingeschlossen werden.

Die Kohorte bestand aus 37 Männern und 7 Frauen, das mediane Alter bei Zystektomie betrug 65 Jahre (40-83 Jahre).

Die Tumorklassifikation der Patienten (ermittelt anhand der TURB- und Zystektomiepräparate) ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

*Tabelle 3: Tumorklassifikation der eingeschlossenen Patienten*

|             | Nach TURB        |                        | Nach Zystektomie |                        |
|-------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
|             | Anzahl Patienten | Prozentuale Verteilung | Anzahl Patienten | Prozentuale Verteilung |
| <b>pT a</b> | 1                | 3%                     | 0                | 0%                     |
| <b>pT 1</b> | 11               | 28%                    | 0                | 0%                     |
| <b>pT 2</b> | 24               | 61%                    | 2                | 5%                     |
| <b>pT 3</b> | 1                | 3%                     | 26               | 59%                    |
| <b>pT 4</b> | 2                | 5%                     | 16               | 36%                    |
| <b>pN 2</b> |                  |                        | 42               | 95%                    |
| <b>pN 3</b> |                  |                        | 2                | 5%                     |
| <b>cM 0</b> |                  |                        | 37               | 86%                    |
| <b>cM 1</b> |                  |                        | 6                | 14%                    |
| <b>G 2</b>  | 7                | 18%                    | 4                | 9%                     |
| <b>G 3</b>  | 31               | 82%                    | 40               | 91%                    |
| <b>R 0</b>  |                  |                        | 35               | 81%                    |
| <b>R 1</b>  |                  |                        | 8                | 19%                    |



Bei der Operation wurden im Median 10 Lymphknoten entfernt (Minimum 2, Maximum 29, Mittelwert 10), davon zeigten sich im Median 4 Lymphknoten tumorinfiltriert (Minimum 1, Maximum 18, Mittelwert 4).

Im Vorfeld war bei 12 Patienten (30%) mehr als eine TURB seit Erstdiagnose und vor Zystektomie durchgeführt worden. Bei 12 Patienten (30%) erfolgte eine Instillationstherapie (10 MMC-, eine BCG-, eine MMC + BCG- und eine Gemcitabin-Instillation).

Die weitere Behandlung nach der Operation konnte bei 39 Patienten verfolgt werden. Von diesen erhielten 58% (23 von 39) der Patienten eine adjuvante Chemotherapie, 10% (4 von 39) eine Radiochemotherapie und 5% (2 von 39) eine Radiotherapie. Bei zwei Patienten wurde eine neoadjuvante Radiochemotherapie durchgeführt, 9 Patienten (23%) erhielten während des Follow-up keine weitere Therapie.

Das Follow-up von 40 Patienten gelang im Median über 11 Monate (Minimum 0, Maximum 176 Monate), zum weiteren Krankheitsverlauf von vier Patienten konnten keine Daten erhoben werden.

55% der Patienten hatten im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv, dies trat im Median sieben Monate nach Zystektomie auf (Minimum 1, Maximum 16, Mittelwert 7,5 Monate). Das progressionsfreie Überleben aller Nachbeobachteten betrug im Median 8 Monate (Minimum 0, Maximum 176 Monate).

31 der 44 eingeschlossenen Patienten konnten bis zu ihrem Tod nachverfolgt werden.

Beim progressionsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den adjuvant chemotherapeutisch behandelten Patienten und denen ohne diese Therapie ( $p=0,44$  für das progressionsfreie und  $p=0,14$  für das Gesamtüberleben).

Ein Unterschied beim Gesamtüberleben nach Geschlecht der Patienten konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden ( $p=0,73$ ).

## 4.2 Etablierung des Analyseverfahrens

In Vorbereitung auf die Analyse der Zielgene wurden zunächst Verdünnungsreihen 1:10 mit den vorgesehenen Primer/Sonden- Paaren in der Zellreihe RT 112 analysiert. Anschließend wurde bei den im Grenzbereich der Nachweisbarkeit liegenden Verdünnungen eine Zehnfachbestimmung der Genexpression durchgeführt. Dadurch wurden das Detektionslimit und die Referenzwerte der Expression festgestellt.

Tabelle 4: Detektionslimits der Genexpressionsbestimmung

|   | ESR 1 | ESR 2 | ERBB 2 | KRT 5  | KRT 20 |
|---|-------|-------|--------|--------|--------|
| <b>Detektionslimit<br/>(Verdünnungsfaktor)</b>              | 0,001 | 0,01  | 0,0001 | 0,0001 | 0,01   |
| <b>C<sub>T</sub> Mittelwert der 10-<br/>fach-Verdünnung</b> | 33,02 | 30,52 | 32,59  | 30,70  | 33,04  |
| <b>Standardabweichung</b>                                   | 0,38  | 0,29  | 0,65   | 0,19   | 0,39   |

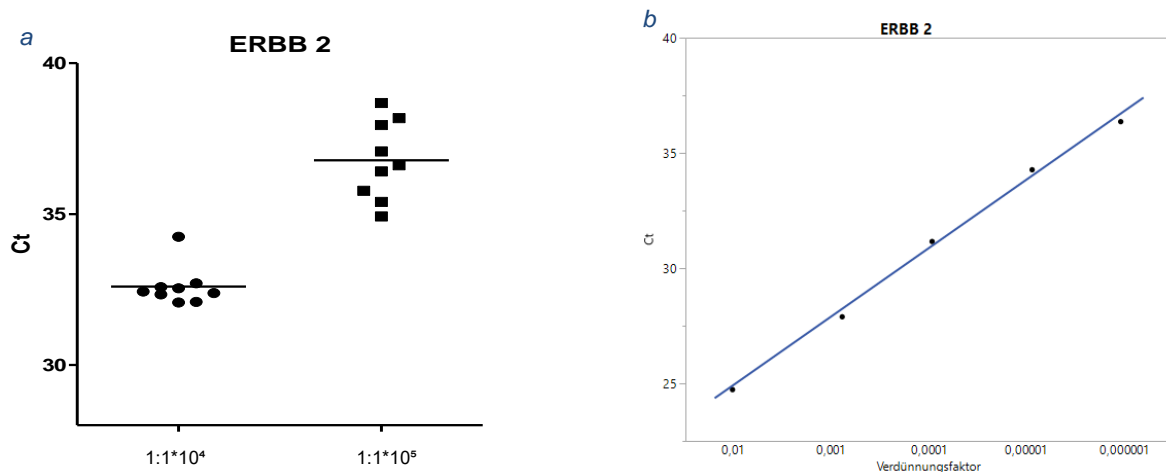


Abbildung 2 a: Die 10-fach Bestimmung von ERBB 2 zeigt die Interassay- Varianz von zwei Verdünnungsstufen am Detektionslimit. Abbildung 2 b: Die Genexpression aufsteigender Verdünnungsstufen veranschaulicht die Effizienz der PCR, welche für die Normalisierung wichtig ist.

### 4.3 Rohwerte der Genexpression aller Gewebe

Für die statistische Auswertung lagen die Genexpressionswerte der fünf Zielgene von 118 Gewebeproben vor. Ausgeschlossen wurden nicht valide Messungen und Messungen außerhalb des Detektionslimits. Die Streubreite war mit einer Standardabweichung von 4,58 bei Keratin 5 und 4,16 bei Keratin 20 am höchsten (siehe Tabelle 5).

*Tabelle 5: Genexpression aller Gewebe ohne Normalisierung*

| <b>Gen</b>    | <b>Minimum<br/>Maximum</b> | <b>Median</b> | <b>Standardabweichung</b> |
|---------------|----------------------------|---------------|---------------------------|
| <b>ESR 1</b>  | 23,95<br>35,49             | 26,90         | 1,76                      |
| <b>ESR 2</b>  | 27,87<br>36,44             | 31,81         | 2,02                      |
| <b>ERBB 2</b> | 23,47<br>38,41             | 30,85         | 2,76                      |
| <b>KRT 5</b>  | 18,66<br>38,53             | 29,30         | 4,58                      |
| <b>KRT 20</b> | 22,83<br>39,50             | 28,97         | 4,16                      |

### 4.4 Genexpression in Abhängigkeit verschiedener Faktoren

#### 4.4.1 Einfluss von Berechnung und Referenzgen auf die Genexpression

Die Genexpressionswerte wurden, wie in Abschnitt 3.4 auf Seite 14 dargestellt, gegenüber den Referenzgenen CALM und RPL normalisiert. Dies ist mit Hilfe von zwei mathematischen Berechnungen möglich. Formel 1 wird im Folgenden als  $40^{-\Delta\Delta C_T}$  oder  $40^{-ddCt}$  angegeben, Formel 2 als  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  bzw.  $2^{-ddCt}$ .

Die Ergebnisse der Berechnungen ist in Abbildung 10 bis Abbildung 13 und in Tabelle 6 bis Tabelle 9 ab Seite 47 dargestellt.

Die mit Formel 1 berechneten  $40-\Delta\Delta C_T$  Werte ermöglichen homogenere Ergebnisse, weshalb die weitere Analyse ausschließlich mit diesen Werten erfolgte.

Für die Normalisierung der Genexpression standen zwei Referenzgene zur Verfügung, CALM und RPL.

Tabelle 10 bis Tabelle 13 im Anhang ab Seite 51 zeigen Median, Minimum, Maximum und Standardabweichung der Genexpression mit CALM bzw. RPL als Referenzgen für die einzelnen Gewebeproben.

Bei der Berechnung mit beiden Referenzgenen ergaben sich vergleichbare Werte, beispielhaft sind die Ergebnisse für ESR 1 und Keratin 5 in Abbildung 3 a und b dargestellt.

Für die weiteren Berechnungen wurde sich auf CALM als Referenzgen beschränkt.

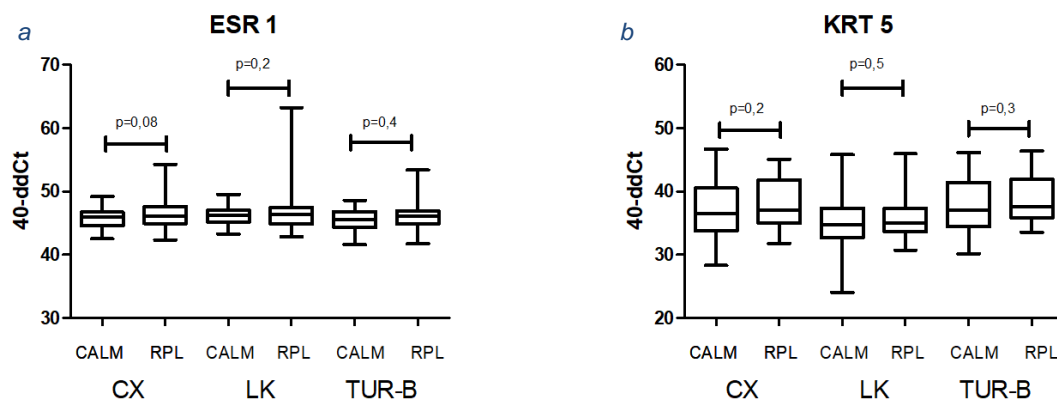


Abbildung 3 a und b: **Gegenüberstellung der Genexpression in den verschiedenen Gewebeproben. ESR 1 und Keratin 5 mit CALM bzw. RPL als Referenzgen.**

#### 4.4.2 Unterschiede in der Genexpression zwischen den Präparaten

In der Mehrzahl der untersuchten Proben war die Genexpression der Zielgene in den verschiedenen Gewebeproben konkordant (siehe Tabelle 14 bis Tabelle 18 ab Seite 55).

Für ESR 1 und ESR 2 (Abbildung 4a und b) waren keine signifikanten Unterschiede messbar.

In einigen Fällen war die Genexpression jedoch statistisch signifikant unterschiedlich:

Die Genexpression von ERBB 2 (Abbildung 4c) war im TURB-Gewebe höher als im Gewebe von Zystektomie (Median TURB vs. Median CX: 38,69 vs. 37,74;  $p=0,0065$ ) und Lymphknoten (Median TURB vs. Median LK: 38,69 vs. 38,03;  $p=0,04$ ).

Keratin 5 ließ sich im Gewebe, welches bei der TURB gewonnen wurde, in höherem Maße nachweisen als im Lymphknotengewebe (Median TURB vs. Median LK: 37,05 vs. 34,78;  $p=0,02$ ; Abbildung 4d).

Keratin 20 war im Gewebe der TURB signifikant höher exprimiert als im Gewebe der Zystektomie (Median TURB vs. Median CX: 46,69 vs. 45,74;  $p=0,03$ ; Abbildung 4e).

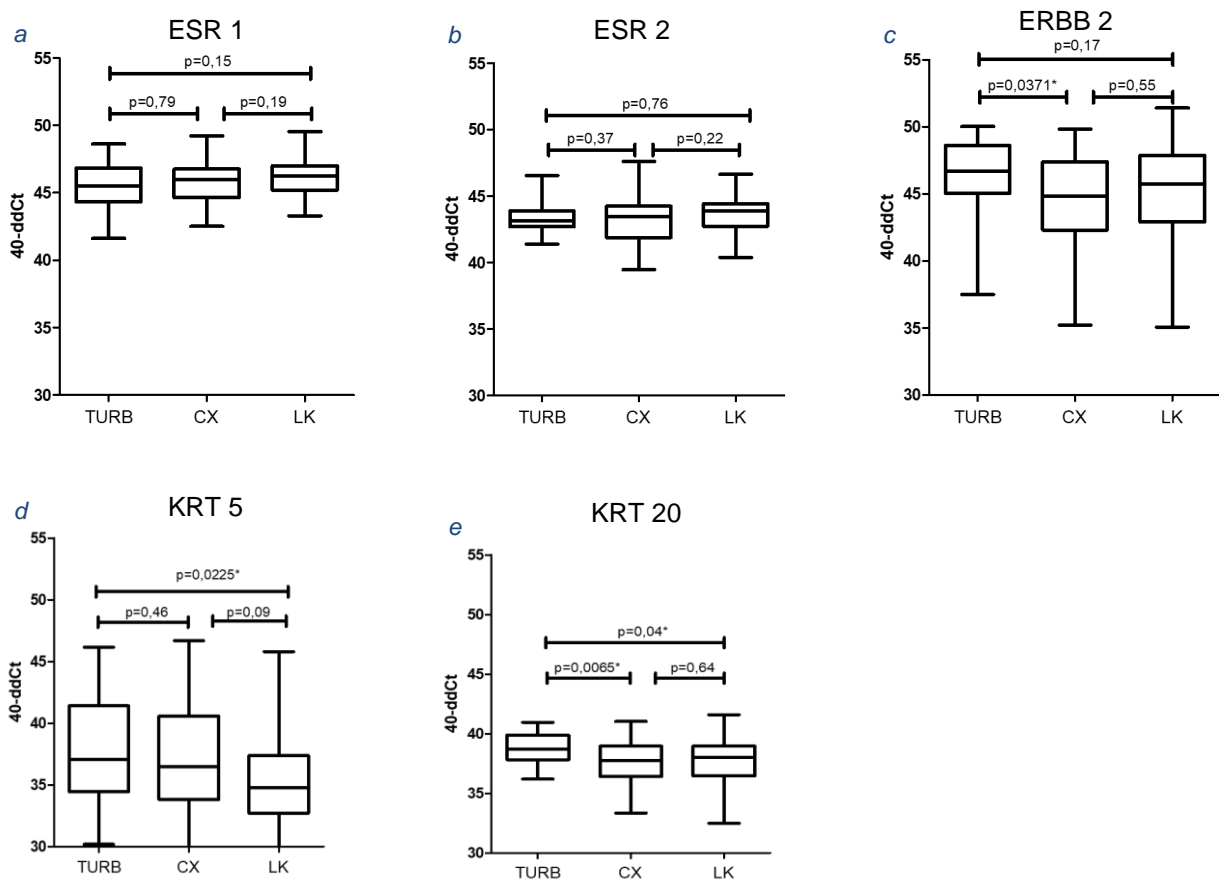


Abbildung 4 a bis e: **Genexpression der Zielgene nach Gewebe.** Abbildung 4a und b: Für ESR 1 und ESR 2 zeigten sich keine Unterschiede in der Genexpression. Abbildung 4c: Für ERBB 2 konnte ein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen TURB und CX- Gewebe festgestellt werden. Abbildung 4d: Die Genexpression von KRT 5 wich zwischen TURB und LK- Gewebe signifikant ab. Abbildung 4e: Einen signifikanten Unterschied zwischen der Genexpression von KRT 20 zeigte sich sowohl im Gewebe von TURB und CX als auch im Gewebe von TURB und LK.

#### 4.4.3 Klinisch- pathologische Einflüsse auf die Genexpression

Um eine Assoziation der klinischen Parameter der Patienten und den histopathologischen Eigenschaften der Gewebeproben zu finden, wurden folgende Analysen durchgeführt.

Die Expression von ESR 1 und ESR 2 wurden nach Geschlecht aufgetragen (siehe Abbildung 5 a und b). Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen diesen beiden Gruppen (ESR 1: TURB:  $p=0,67$  CX:  $p=0,71$  LK:  $p=0,19$ ; ESR 2: TURB:  $p=0,88$  CX:  $p=0,49$  LK:  $p=0,11$ ). Ebenso war für die anderen Gene kein geschlechtsspezifischer Unterschied erkennbar (siehe Tabelle 19 auf Seite 57).

Ob eine Assoziation des Tumorstadium mit der Genexpression vorlag, wurde durch einen Vergleich der Genexpression der Patienten mit T2 und T3 Stadium ( $n=28$ ) gegen die Patienten mit T4 ( $n=16$ ) für das Gewebe der Zystektomie und der Lymphknoten geprüft. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 20 auf Seite 58).

Um eine Abhängigkeit der Genexpression vom Anteil der Tumorzellen im analysierten Gewebe auszuschließen, wurden die vorliegenden Gewebeschnitte in zwei Gruppen eingeteilt: Schnitte mit mehr und Schnitte mit weniger als 50% Tumorzellen am gesamten Zellanteil. Anschließend wurde die Genexpression dieser beiden Gruppen verglichen. Dabei ergab sich, mit Ausnahme der Gene ERBB 2, Keratin 5 und Keratin 20 im Lymphknotenmetastasengewebe, keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle Tabelle 21 auf Seite 59).

Die Zeit, die zwischen der TURB, aus der die vorliegende Gewebeprobe stammt, und der Zystektomie vergangen ist, unterscheidet sich in der vorliegenden Kohorte zum Teil deutlich (Median 40 Tage, Minimum 7 Tage, Maximum 526 Tage). Es wurde untersucht, ob die Länge der Zeitspanne zwischen TURB und Zystektomie einen Einfluss auf die Differenz der Genexpression dieser Gewebe hatte.

Die Differenz der gemessenen Genexpression zwischen den Geweben ist generell niedrig (siehe Tabelle 22 auf Seite 60). Sie betrug für TURB- und Zystektomie-Gewebe für ESR 1, ESR 2, ERBB 2 und KRT 5 im Mittel weniger als 1, für KRT 20 lag der Mittelwert bei 2,13.

Um eventuell vorliegende Unterschiede zu erkennen, wurden drei Berechnungen mit jeweils unterschiedlichen Teilungspunkten der Kohorte durchgeführt.

Dazu wurde die Gruppe am Median (40 Tage) der Tage zwischen TURB und Zystektomie, am oberen (60 Tage) und unteren Quartil (26 Tage) getrennt.

Für kein Gen ergab sich an einem der Trennungspunkte ein signifikanter Unterschied der Differenz der Genexpression (siehe Tabelle 23).

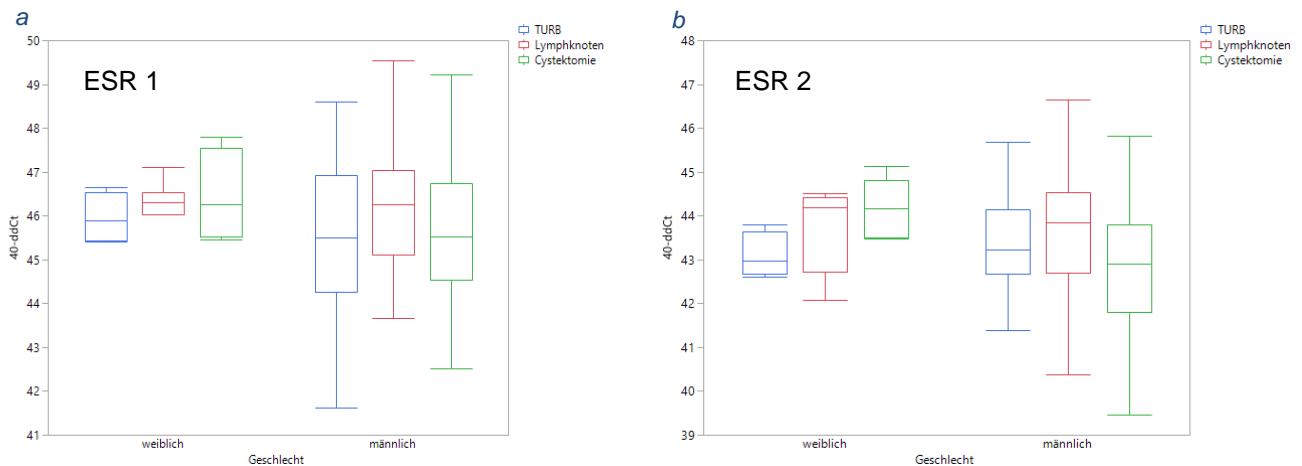


Abbildung 5 a und b: **Genexpression der Östrogenrezeptoren, getrennt nach Geschlecht und Gewebe.** Weder für ESR 1 noch für ESR 2 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

#### 4.5 Korrelation der Genexpression zwischen den Gewebeproben

Die Überprüfung der Übereinstimmung der Genexpression zwischen Primarius, einer Lymphknotenmetastase und der bei der TURB gewonnenen Gewebeprobe ist klinisch hoch relevant. Diese wurde mit Hilfe des Spearmans-Korrelationskoeffizienten überprüft (siehe Abbildung 6 und Tabelle 24 auf Seite 61).

Für ESR 1 ergab sich eine Übereinstimmung zwischen TURB und Lymphknoten (Spearman  $\rho=0,57$ ,  $p=0,0009$ ), sowie zwischen Zystektomie und Lymphknoten (Spearman  $\rho=0,39$ ,  $p=0,0085$ ).

Die Genexpression von ESR 2 war zwischen dem Gewebe der TURB und der Zystektomie gegenseitig verknüpft (Spearman  $\rho=-0,42$ ,  $p=0,02$ ).

Im Fall von ERBB 2 war eine Korrelation zwischen TURB und Zystektomie (Spearman  $\rho=0,62$ ,  $p=0,0003$ ), TURB und Lymphknoten (Spearman  $\rho=0,53$ ,  $p=0,0025$ ) sowie Zystektomie und Lymphknoten (Spearman  $\rho=0,75$ ,  $p<0,0001$ ) gegeben.

Für Keratin 5 war die Korrelation besonders deutlich nachweisbar, für TURB und Zystektomie betrug Spearman  $\rho=0,81$  ( $p<0,0001$ ), für TURB und Lymphknoten galt der Zusammenhang ebenso stark (Spearman  $\rho=0,83$ ;  $p<0,0001$ ). Zystektomie und

Lymphknoten hatten ebenfalls einen deutlichen Zusammenhang (Spearman  $\rho=0,66$ ), der statistisch signifikant war ( $p<0,0001$ ).

Die Übereinstimmung der ermittelten Genexpressionswerte von Keratin 20 zwischen den verschiedenen Geweben war statistisch ebenfalls signifikant und erreichte Spearman  $\rho$ -Werte zwischen  $\rho=0,43$  (TURB und Lymphknoten) und  $\rho=0,64$  (TURB und Zystektomie).

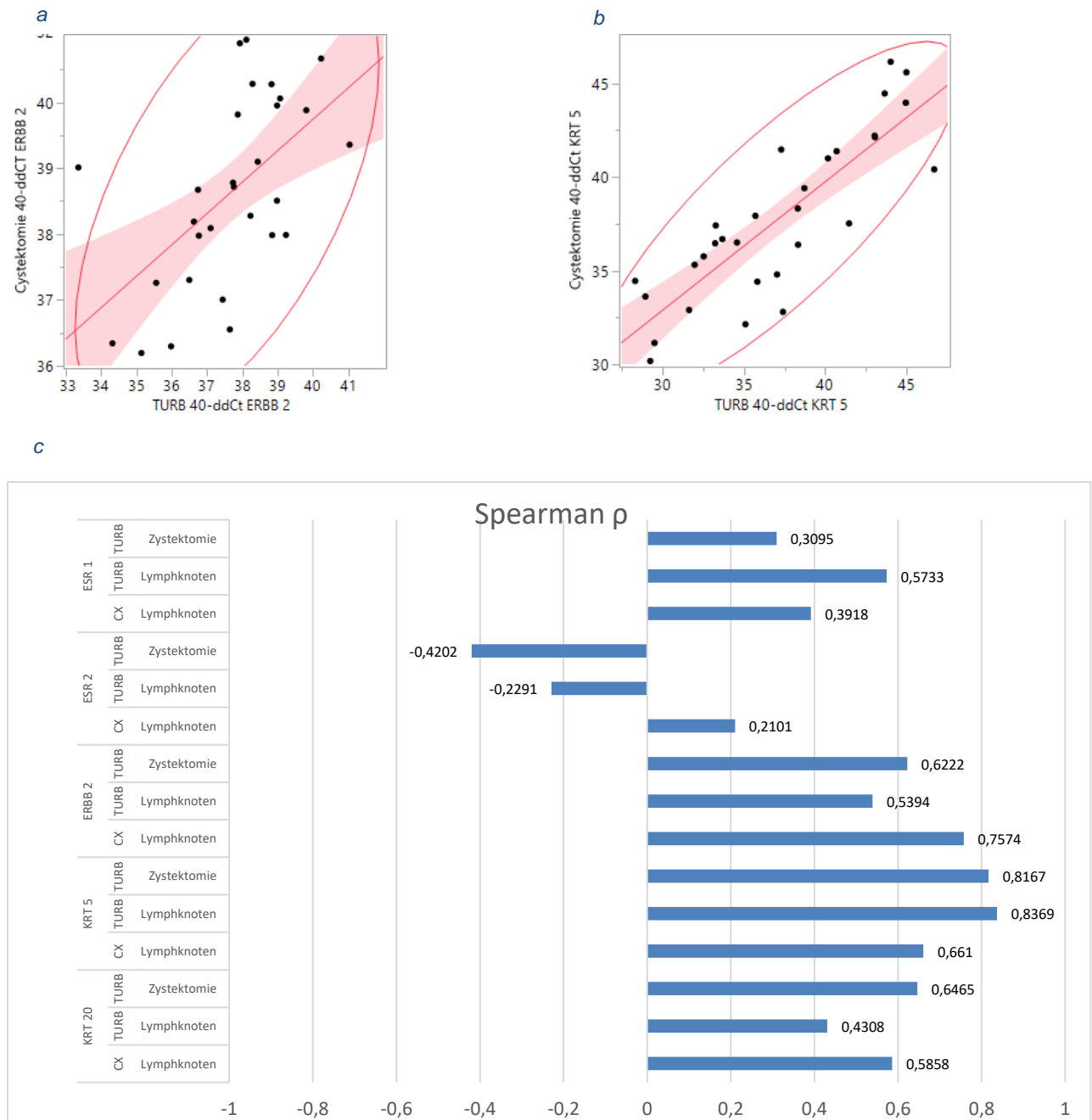


Abbildung 6 a bis c: **Korrelation der Genexpression zwischen den Gewebeproben.** Abbildung 6a zeigt die signifikante Korrelation von ERBB 2 zwischen TURB und CX ( $\rho=0,6222$ ,  $p=0,0003$ ). Abbildung 6b: Für KRT 5 ergab sich zwischen TURB und CX eine signifikante Korrelation ( $\rho= 0,8167$ ,  $p<0,0001$ ). Abbildung 6c: Übersicht über die ermittelten Spearman- Korrelationskoeffizienten der unterschiedlichen Gene zwischen den jeweiligen Gewebeproben.



## 4.6 Überlebensanalysen

### 4.6.1 Gesamtüberleben abhängig von der Genexpression

Um die Assoziation der Genexpression der untersuchten Gene mit dem Überleben der Patienten zu untersuchen, wurde jeweils die Kohorte am Median der Genexpression geteilt und die Überlebensdaten der Gruppen verglichen.

Es konnten, bis auf die am Median der ERBB 2- Genexpression in der TURB geteilten Gruppe ( $p=0,0318$ ), keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, die Ergebnisse sind in Tabelle 25 im Anhang auf Seite 62 im Einzelnen dargestellt.

Um statt des Medians einen optimierten Grenzwert zur Trennung der Gruppe zu erhalten, wurde ein Partitionstest durchgeführt. Teilte man die Kohorte mit dieser Hilfe in zwei Gruppen, ergaben sich teils signifikante Überlebensunterschiede je nach Gruppenzugehörigkeit, die in Tabelle 25 auf Seite 62 zusammengefasst sind.

Patienten mit einer Expression von ESR 1  $<45,30$  in der Zystektomie hatten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben als die Patienten mit Werten  $>45,30$  (siehe Abbildung 7c; HR=0,35; KI: 0,16-0,78;  $p=0,005$ ). Ebenso verhielt es sich bei ESR 2 im Zystektomiegewebe (Gruppen getrennt bei 42,15; HR=0,45; KI: 0,2-1,07;  $p=0,045$ ).

Bei der Trennung der Gruppen nach ERBB 2 ergab sich ein nicht einheitliches Bild. Signifikant länger überlebte die Gruppe mit der höheren Genexpression im Gewebe der TURB (Gruppen getrennt bei 38,71; HR=0,35; KI: 0,12-0,91;  $p=0,03$ ), im Gewebe der Zystektomie war eine geringere Genexpression mit einem Überlebensvorteil verbunden (Gruppen getrennt bei 38,84; HR=2,74; KI:1,24-5,79;  $p=0,01$ ; siehe Abbildung 7d).

Für die Gruppen getrennt nach der Expression von Keratin 5 ließ sich kein statistisch signifikanter Überlebensunterschied ermitteln.

Der Teil der Gesamtkohorte mit niedriger Expression von Keratin 20 im Gewebe der TURB hatten ein kürzeres Überleben als die Patienten mit hoher Genexpression (Gruppen getrennt bei 48,36; HR=0,29; KI:0,06-0,9;  $p=0,03$ ).

Das Gesamtüberleben der Gruppe, eingeteilt nach der Genexpression der übrigen Gewebeproben, ergab keine statistisch signifikanten Werte.

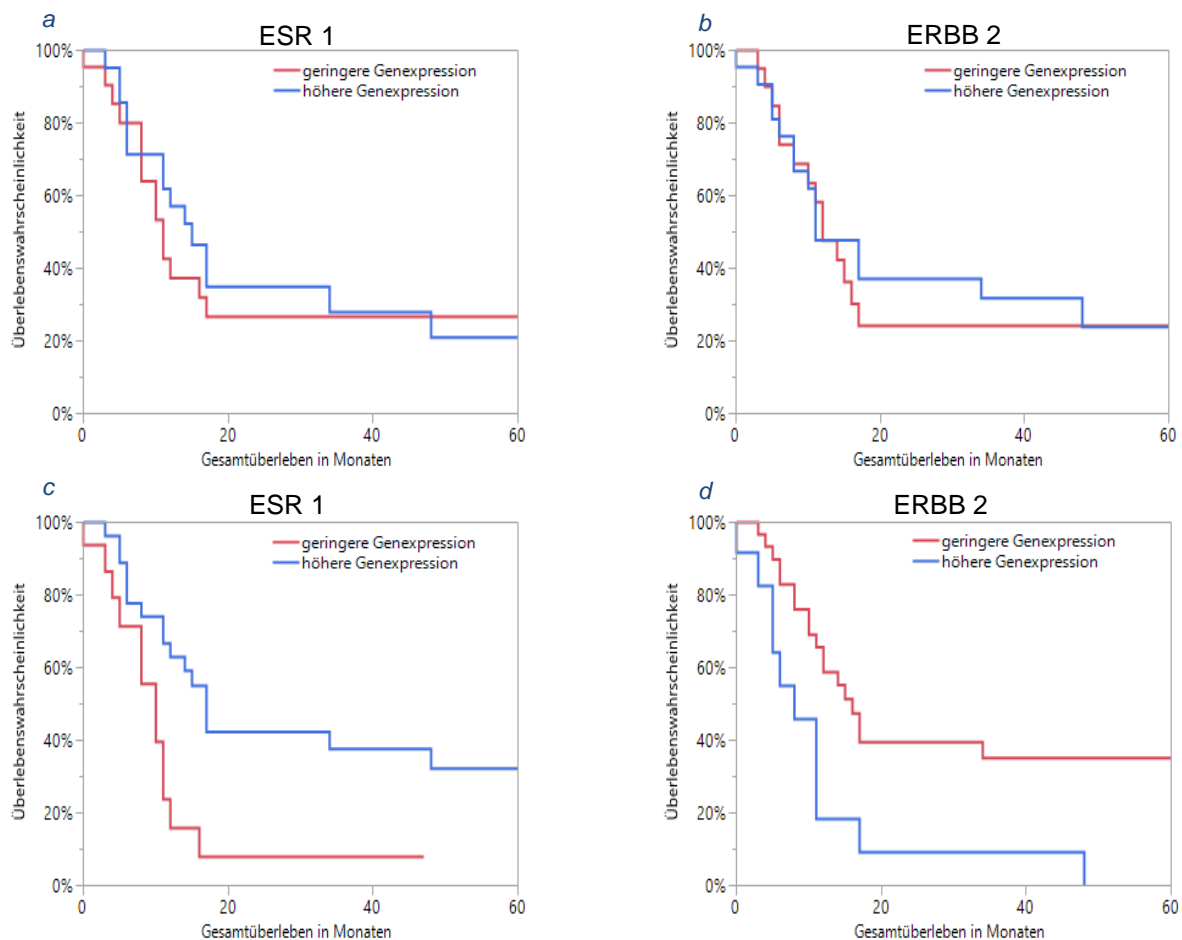


Abbildung 7 a bis d: **Gesamtüberleben nach Genexpression im Gewebe der Zystektomie.** Abbildung 7 a und b: Die Kohorte wurde am Median der ESR 1- bzw. ERBB 2- Genexpression in der Zystektomie getrennt. Das Gesamtüberleben zeigte keinen signifikanten Unterschied (ESR 1:  $p=0,59$ ; ERBB 2:  $p=0,68$ ). Abbildung 7 c und d: Getrennt mit Hilfe des Partitionstests ermittelten Grenzwert ergaben sich signifikante Überlebensunterschiede für in der Zystektomie ermittelten Genexpressionswerte von ESR 1 ( $p=0,005$ ) und ERBB2 ( $p=0,01$ )

#### 4.6.2 Progressionsfreies Überleben

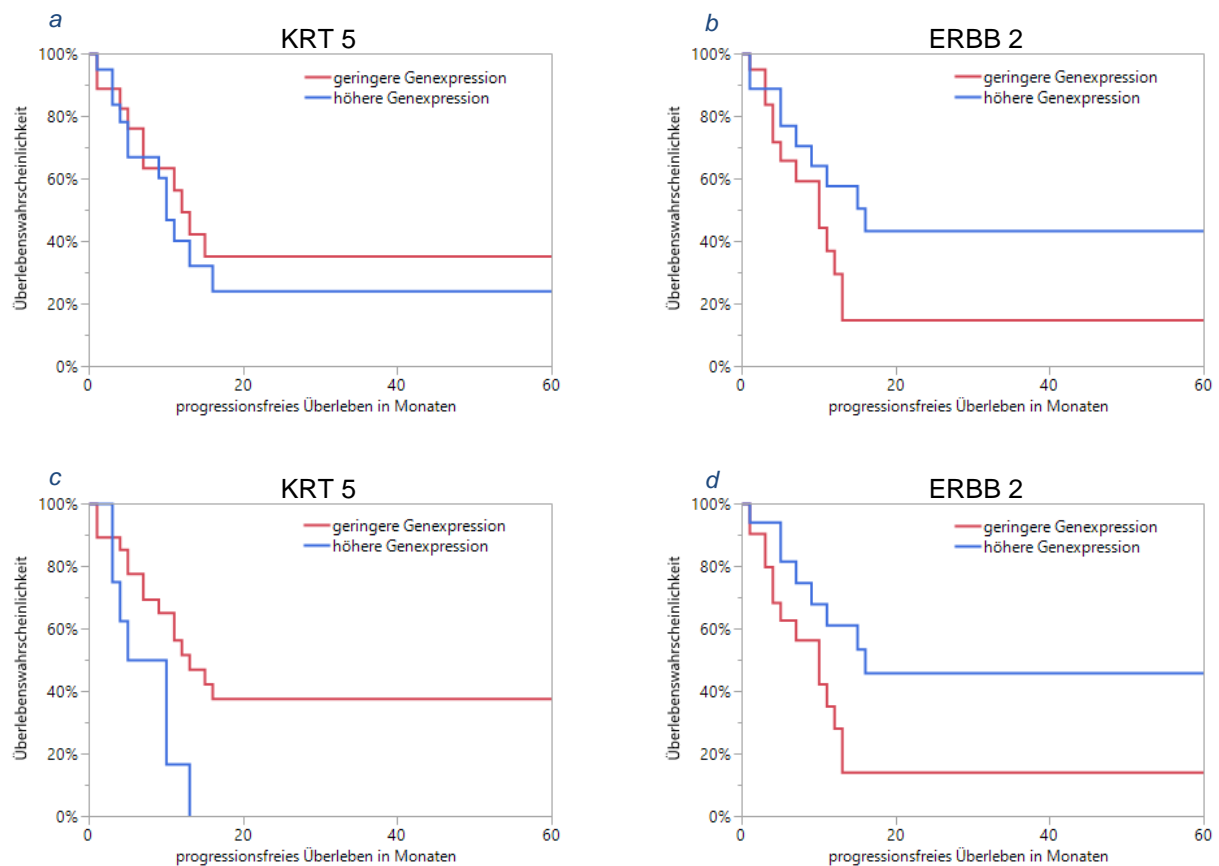
Ein signifikanter Unterschied beim progressionsfreien Überleben zwischen zwei am Median der Genexpression getrennten Gruppen konnte für ESR 2 im Lymphknotengewebe (Gruppen getrennt bei 43,86; HR=2,33; KI: 0,88-5,57;  $p=0,0501$ ) und für ERBB 2 am TURB- Gewebe (Gruppen getrennt bei 38,69; HR=0,27; KI: 0,08-0,82;  $p=0,0208$ ) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 27 im Anhang auf Seite 64).

Eine weitere Analyse mit nach Partitionstest geteilten Gruppen ergab ebenfalls signifikante Unterschiede im progressionsfreien Überleben.

Für ESR 1 ergab sich kein signifikanter Zusammenhang. Für ESR 2 ergab sich für Patienten mit niedrigerer Genexpression im Lymphknotengewebe eine längere progressionsfreie Zeit (Gruppen getrennt bei 44,05; HR=3,06; KI: 0,16-1,22;  $p=0,01$ ).

Eine hohe Genexpression von ERBB 2 im Gewebe der TURB und der Zystektomie war mit einer längeren progressionsfreien Zeit verknüpft (TURB: Gruppen getrennt bei 38,72; HR=0,27; KI: 0,08-0,82; p=0,02; CX: Gruppen getrennt bei 37,74; HR=0,41; KI: 0,16-0,98; p=0,04; siehe Abbildung 8d).

Für Keratin 5 ergab sich nach Einteilung durch den Partitionstest für eine geringere Genexpression in allen Geweben eine längere progressionsfreie Zeit (TURB: Gruppen getrennt bei 41,38; HR=6,52; KI: 1,85-25,63; p=0,004; CX: Gruppen getrennt bei 40,70; HR=2,76; KI: 1,01-6,94; p=0,04; siehe Abbildung 8c; LK: Gruppen getrennt bei 37,55; HR=2,52; KI: 1,00-5,96; p=0,04). Eine hohe oder niedrige Genexpression von Keratin 20 hatte keinen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben.



**Abbildung 8: Progressionsfreies Überleben nach Genexpression im Gewebe der Zystektomie.** Abbildung 8 a und b: Die Kohorte wurde am Median der KRT 5- bzw. ERBB 2- Genexpression in der Zystektomie getrennt. Das Gesamtüberleben zeigte keinen signifikanten Unterschied (KRT 5:  $p=0,54$ ; ERBB 2:  $p=0,1$ ). Abbildung 8 c und d: Getrennt mit Hilfe des Partitionstests ermittelten Grenzwert ergaben sich signifikante Überlebensunterschiede für in der Zystektomie ermittelten Genexpressionswerte von KRT 5 ( $p=0,04$ ) und ERBB2 ( $p=0,04$ )

#### 4.7 Einteilung in luminale und basale Subtypen

Die Einteilung der Patienten in Gruppen mit luminalen und basalen Tumoren wurde in Anlehnung an die molekularbiologische Taxonomie unterschiedlicher Arbeitsgruppen durchgeführt (siehe Abschnitt 1.2.1). Vereinfachend wurde hierzu die Markerexpression von Keratin 5 und 20 herangezogen.

Die Gewebe mit einer Expression von Keratin 5 höher als der Median und einer Expression von Keratin 20 niedriger als der Medianwert wurden als basale Tumoren identifiziert (n=7). Eine gegensinnig konfigurierte Genexpression beschrieb die luminalen Tumoren (n=9). Gewebe, die sich nach diesen Kriterien keiner Gruppe zuordnen ließen, wurden separat erfasst (n=28).

Zudem wurde ein Partitionstest durchgeführt, um die Patienten in Bezug auf das Gesamtüberleben an einer geeigneten Schwelle der Genexpression zu trennen.

Hierbei konnten 8 Tumoren als basale, 20 Tumoren als luminale und 16 Tumoren nicht klassifiziert werden.

Zwischen den mit Hilfe des Partitionstest getrennten Gruppen konnten signifikante Unterschiede im Überleben und im progressionsfreien Überleben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9b und Abbildung 9d).

Wegen der hohen Anzahl unspezifischer Tumoren in der vorliegenden Kohorte wurde Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben der Patienten mit basalen Tumoren (Median als Trennung: n=7; Partitionstest als Trennung n=8) verglichen mit den Patienten mit unspezifischen oder luminalen Tumoren (Median als Trennung: n=37; Partitionstest als Trennung n=36) berechnet.

Auch diese Analysen erbrachten keine signifikanten Unterschiede für Gesamtüberleben (Median: p=0,31; Partitionstest: p=0,28) oder progressionsfreies Überleben (Median: p=0,47; Partitionstest: p=0,80).

Bei der Verteilung des Tumorstadiums ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit luminaler und basaler Konfiguration.

Auch ein Unterschied bei der Geschlechterverteilung je nach Tumorkonfiguration konnte nicht gefunden werden.

Die Expression von Östrogenrezeptoren abhängig von der luminalen oder basalen Konfiguration wurde in der vorliegenden Kohorte ebenfalls untersucht. Eine vermehrte Expression dieser Rezeptoren bei luminalen Tumoren konnte nicht nachgewiesen werden.

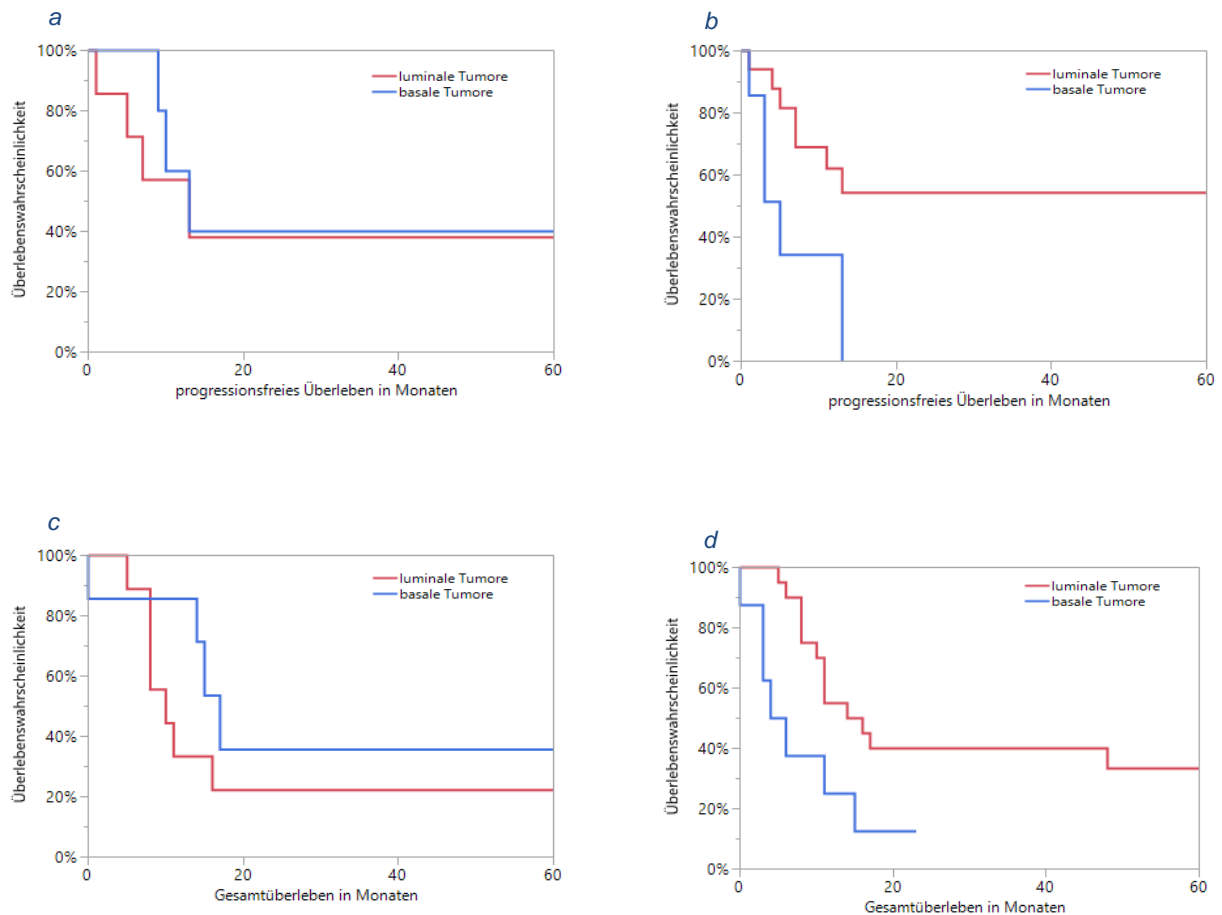


Abbildung 9 a und b: **Progressionsfreies Überleben der Patienten mit luminalen und basalen Tumoren.** Abbildung 9 a: Patientenkohorte am Median der Genexpression getrennt und in luminalen und basalen Tumoren eingeteilt. Das progressionsfreie Überleben war nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,65$ ). Abbildung 9 b: Die Gruppen wurden nach Trennung mit Hilfe des Partitionstests eingeteilt. Ein statistisch signifikanter Unterschied des progressionsfreien Überlebens war erkennbar ( $p=0,0178$ ).

Abbildung 9 c und d: **Gesamtüberleben der Patienten mit luminalen und basalen Tumoren.** Abbildung 9 c: Patientenkohorte am Median der Genexpression getrennt und in luminalen und basalen Tumoren eingeteilt. Das Gesamtüberleben war nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,31$ ). Abbildung 9 d: Die Gruppen wurden nach Trennung mit Hilfe des Partitionstests eingeteilt. Ein statistisch signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben war erkennbar ( $p=0,0211$ ).

## 5 Diskussion

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigen Tumorerkrankungen des Menschen. Die Behandlung hat in den letzten Jahren kaum signifikante Fortschritte gemacht,<sup>10</sup> weshalb die Forschung in diesem Bereich von großer Relevanz ist.

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Analyse der Genexpression verschiedener Markergene eine Abschätzung der Prognose ermöglicht<sup>34, 61</sup> und die Identifikation von Parametern, die zur Evaluation des Therapieansprechens<sup>10</sup> genutzt werden können, erleichtert.

Bei Patienten mit metastasiertem, muskelinvasiven Harnblasenkarzinom stehen zur Genexpressionsanalyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Gewebeproben zur Verfügung (TURB, Zystektomie, Lymphknotenmetastase).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob eine Konkordanz der Genexpression zwischen den Geweben gegeben ist und ob sich Unterschiede in klinischen Kriterien oder dem Überleben je nach Genexpressionsmuster ergeben.

### 5.1 Material, Methode und Auswahl der Zielgene

Die für die Analyse zur Verfügung stehenden Gewebeproben stammen von einem Patientenkollektiv, deren Zystektomie an einer Klinik durchgeführt wurde. Die Vor- und Nachbehandlung fand teilweise an anderen Kliniken statt. Die pathologische Evaluation der Zystektomie- und Lymphknotengewebe wurde bei allen Patienten durch die Pathologen eines Instituts durchgeführt. Wurde die TURB und die pathologische Analyse der TURB-Gewebe in anderen Kliniken durchgeführt, standen die Proben für die vorliegende Untersuchung nicht zur Verfügung.

Diese Tatsachen, gemeinsam mit dem retrospektiven Charakter der Untersuchung, stellen Limitationen der Arbeit dar. Eine größere Kohorte, eine standardisierte Nachbehandlung und -verfolgung, sowie eine Reevaluation der pathologischen Einordnung der Tumoren würden die Aussagekraft der Analyse verstärken.

Für die Analyse wurde die mRNA- Expression von fünf Genen in Gewebeproben der transurethralen Blasenresektion, des Primarius nach Zystektomie und tumorinfiltrierter Lymphknoten beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom mit Hilfe molekularbiologischer Methoden untersucht.

Die qPCR ist zur Ermittlung der mRNA- Genexpression für die vorliegende Fragestellung ein etabliertes Verfahren.<sup>57</sup> Immunhistochemische Methoden könnten für diese Analyse aber genauso genutzt werden wie genomweite RNA-Expressionsanalysen.<sup>11, 13</sup> Der Vorteil der qPCR gegenüber immunhistochemischen Untersuchungen ist die anwenderunabhängige Objektivierbarkeit der Ergebnisse. Die Analyse der Fülle der Daten einer genomweiten Expressionsanalyse ist vergleichsweise aufwändig und für die vorliegende Fragestellung zu weitreichend. Der Wert solcher Untersuchungen, die meist auch mit großen Kohorten durchgeführt werden, ist vor Allem einen Überblick über die Expression verschiedenster Gene zu geben. Weiterführende Untersuchungen werden zumeist mit fokussierten Verfahren wie der qPCR durchgeführt.

Bei der Auswahl der Gene wurde zum einen beachtet, welche Gene eine Unterteilung der Kohorte in basale und lumbale Tumoren zulässt (v.a. Keratin 5 und Keratin 20),<sup>12, 17, 40</sup> zum anderen wurden Gene analysiert, für die zielgerichtete Therapien zur Verfügung stehen (Östrogenrezeptoren und ERBB 2).<sup>2, 10, 23, 24, 50</sup> Eine große Anzahl weiterer Gene steht zur Charakterisierung der Gewebe zur Verfügung,<sup>15, 48</sup> weshalb eine Beschränkung auf einige wenige in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Fragestellung sinnvoll und notwendig ist.

Die Einteilung in molekulare Subgruppen (luminal vs. basal), um diese mit klinischen Eigenschaften oder Überlebensdaten zu vergleichen, gelang in der vorliegenden Untersuchung nur bei einem Teil der Patienten. Viele Tumoren konnten nicht eindeutig einer Subgruppe zugeordnet werden. Ein Grund dafür könnten die hier genutzten Grenzwerte für die jeweilige Einteilung sein, deren Festlegung anhand einer vergleichsweise kleinen Kohorte erfolgte. Außerdem wurde nur eine kleine Auswahl an Genen analysiert, die für die Einteilung zur Verfügung stehen, wodurch diese zusätzlich erschwert wurde.

Andere Arbeitsgruppen nutzten eine andere Auswahl von Genen zur Definition der Subgruppen<sup>34</sup> oder bedienten sich genomweiter Expressionsanalysen und konnten so auf eine deutlich größere Anzahl molekularer Markergene zur Einteilung zurückgreifen.<sup>9, 12, 16, 48</sup>

In diesem Hinblick ist die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit limitiert, da die Einteilung in die molekularen Subgruppen mit nur zwei Markergenen durchgeführt wurde.

## 5.2 Genexpression in Abhängigkeit verschiedener Faktoren

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Genexpression von unterschiedlichen klinisch-pathologischen Einflüssen untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Genexpression abhängig von klinischen oder pathologischen Charakteristika.

Ein Einfluss des Tumoranteils des zur Verfügung stehenden Gewebes auf die Genexpression wurde in der vorliegenden Studie untersucht, um dies als möglichen Fehler bei der Bewertung der Expressionshöhe auszuschließen. Dabei konnte festgestellt werden, dass es, außer bei drei Genen im Lymphknotengewebe, keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen unterschiedlicher Tumoranteile gab. Für die Isolation der RNA und die Weiterverarbeitung wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Kits verwendet, die jeweils eine technische Validierung durch die Hersteller durchlaufen haben und die in diesen eine hohe Robustheit ihrer Ergebnisse bewiesen haben.<sup>25, 36</sup> Allerdings wurde der prozentuale Anteil der Tumorzellen nur durch einen Untersucher bewertet. Hierin könnte eine Ursache von Varianz liegen.

### 5.2.1 Konkordanz der Genexpression

Die Konkordanz der Genexpression zwischen den Gewebeproben desselben Patienten stand im Fokus dieser Untersuchung. Dies ist im Hinblick auf zielgerichtete Therapien besonders wichtig, damit Zielstrukturen definiert werden können, die in allen Tumoranteilen exprimiert sind, um eine möglichst umfassende Wirkung zu erreichen.

Der direkte Vergleich der Genexpression zeigte für die Östrogenrezeptoren keine Unterschiede zwischen den Gewebeproben. Für ERBB 2 zeigte sich im Gewebe der TURB eine signifikant höhere Genexpression als im Gewebe der Zystektomie und des Lymphknoten. Im TURB-Gewebe war die Genexpression von Keratin 5 höher als in der Zystektomie, von Keratin 20 höher als im Lymphknoten. Keine Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der Genexpression im Gewebe der Zystektomie und der Lymphknotenmetastase.

Vier Arbeitsgruppen<sup>5, 20, 22, 32</sup> publizierten Untersuchungen der Her2/neu-Konfiguration von Harnblasenkarzinomen und der korrespondierenden Lymphknotenmetastasen, eine Arbeitsgruppe<sup>31</sup> von Keratin 20. Für die Fragestellung



hinsichtlich Keratin 5 und der Östrogenrezeptoren konnten keine publizierten Untersuchungen für das Urothelkarzinom gefunden werden.

Jiang et al.<sup>31</sup> haben in den Gewebeproben von 26 Patienten mit Hilfe der Immunhistochemie eine Konkordanz in allen Fällen für Keratin 20 in Zystektomie- und Lymphknotengewebe nachgewiesen.

Bolenz et al.<sup>5</sup> untersuchten mit immunhistochemischen Methoden und Bewertungsprotokollen die Gewebeproben von 198 Patienten. Dabei fanden sie im Lymphknotengewebe eine höhere Rate Her2-positiver Proben als im Zystektomiepräparat.

Fleischmann et al.<sup>20</sup> führten eine Analyse der Gewebeproben von 150 Patienten durch. Dazu nutzten sie Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und ein für Mamatumoren entwickeltes immunhistochemisches Untersuchungs- und Bewertungsprotokoll (HercepTest®). Damit konnten sie zeigen, dass Her/neu häufig exprimiert ist, in Lymphknotenmetastasen häufiger als im korrespondierenden Primarius. Je nach angewandter Methode zeigten sich jedoch Unterschiede, auch was die Auswirkung des Her2-Status auf das Überleben betrifft.

Gardmark et al.<sup>22</sup> untersuchten ebenfalls mit Hilfe der Immunhistochemie und dem HercepTest® Gewebeproben von 90 Patienten mit metastasiertem Harnblasenkarzinom. Dabei konnten sie eine hohe Übereinstimmung des Her2-Status des Primarius (Gewebe aus TURB oder Zystektomie) mit dem der Fernmetastase und der regionalen Lymphknotenmetastase finden.

Jimenez et al.<sup>32</sup> analysierten mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und Bewertungsprotokollen Tumor- und Metastasengewebe von 60 Patienten. Das Tumorgewebe stammte in den meisten Fällen (57 von 60) aus einer Zystektomie, in drei Fällen war eine TURB die einzige chirurgische Therapie. In 32 Fällen stand auch das Gewebe einer Lymphknotenmetastase, in 7 Fällen das Gewebe einer Fernmetastase zur Verfügung.

Dabei zeigte sich bei Überexpression im Primärtumor signifikant häufig auch eine Überexpression im Lymphknoten- bzw. Fernmetastasengewebe. Allerdings konnte auch bei negativem Primarius in 45% der Fälle (9 von 20) in den Lymphknotenmetastasen und in 67% der Fälle (2 von 3) im Fernmetastasengewebe eine Her2/Neu- Überexpression nachgewiesen werden.

Die unterschiedlichen Daten der oben genannten Publikationen und die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zur Konkordanz der Her2/neu- Expression zwischen Primarius und Lymphknotenmetastasengewebe könnten für eine Heterogenität des Tumors selbst oder eine „Tumorevolution“ sprechen, bei der sich der Her2/neu- Status mit der Zeit ändert. Dies würde für eine Re-Biopsie und erneute Her2/neu Statusbestimmung beim Auftreten einer Metastase sprechen, um diese genau zu klassifizieren falls dies eine Änderung der Therapie nach sich ziehen würde.

Für Gewebeproben von Tumoren der Brust ist die Konkordanz der Genexpression von Her2/neu und der Hormonrezeptoren in Primarius und synchron tumorinfiltrierten Lymphknoten von mehreren Arbeitsgruppen, auch mit Hilfe der qPCR, untersucht worden.<sup>49, 59</sup> Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen der Genexpression der verschiedenen Gewebe vor allem für die Östrogenrezeptoren. Für Her2/neu ergibt sich eine uneindeutige Datenlage, da einige Autoren von hoher Korrelation, andere von diskordanten Expressionsraten ausgehen. Allerdings hat die Relevanz dieser Diskrepanz mittlerweile abgenommen, da die Lymphknotenentfernung bei der Behandlung des Mammakarzinoms seit einigen Jahren immer weiter in den Hintergrund tritt und die Festlegung des Hormon- und Her2/neu-Rezeptor-Status regelhaft mit Gewebe einer Stanzbiopsie festgelegt wird.<sup>58</sup>

Bei der Therapie des Mammakarzinom- Rezidiv ist eine erneute Bestimmung des Rezeptorstatus regelhaft vorgesehen,<sup>58</sup> da eine diskordante Genexpression von Östrogenrezeptoren und Her2/neu zwischen Primarius und metachron aufgetretener Metastase als sicher gilt.<sup>1, 60</sup>

Die „zeitliche Stabilität“ der Genexpression des Urothelkarzinoms, bezogen auf das metachrone Auftreten von Metastasen, war nicht primäres Ziel dieser Untersuchung, da die verwendeten Gewebeproben von Zystektomie und Lymphknotenmetastase bei allen Patienten aus derselben Operation stammten. Auch wurden in der vorliegenden Analyse keine Fernmetastasen mit einbezogen. Die Erkenntnisse der veränderten Genexpression beim Rezidiv des Mammakarzinoms und die Heterogenität der für das Urothelkarzinom publizierten Daten sprechen jedoch für die Notwendigkeit weiterer Forschung in diese Richtung.

Durch die vorliegende Untersuchung wurde die Konkordanz der Genexpression beim Urothelkarzinom mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Die Ergebnisse ermutigen, auch durch die Erkenntnisse und therapeutischen Fortschritte beim Mammakarzinom, weitere Forschung durchzuführen. Insbesondere die heterogene Studienlage zur Konkordanz der Genexpression einzelner Rezeptoren und zur zeitlichen Stabilität des Rezeptorstatus sind von hoher klinischer Relevanz zur Entwicklung und Optimierung zielgerichteter Therapien und bedürfen weiteren Untersuchungen.

### 5.2.2 Überlebensanalysen

Beim Gesamtüberleben konnten, abhängig von der im Zystektomiegewebe gemessenen Genexpression nach Einteilung durch Partitionstests, signifikante Unterschiede festgestellt werden. Patienten mit einer niedrigeren ESR 1 und ESR 2 Expression lebten signifikant kürzer als Patienten mit hoher Genexpression.

Für ERBB 2 ergab sich ein längeres Überleben bei geringerer Genexpression in der Zystektomie, im Gewebe der TURB war die geringere Genexpression jedoch mit einem kürzeren Überleben verknüpft.

Die Höhe der Expression von Keratin 5 hatte in dieser Untersuchung keine prognostische Relevanz, bei Keratin 20 ergab sich je nach Gewebeart ein unterschiedliches Bild.

Für das progressionsfreie Überleben ergaben sich signifikante Unterschiede je nach Genexpression. Eine niedrige ESR 2 Expression im Lymphknotengewebe war mit einer längeren progressionsfreien Zeit verknüpft. Genauso verhielt es sich für Keratin 5 in allen drei Gewebeproben. Dagegen war eine hohe Genexpression von ERBB 2 im Gewebe der TURB und der Zystektomie mit einer längeren progressionsfreien Zeit verbunden.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben den Zusammenhang der Expression von ERBB2 mit der klinischen Prognose der Patienten untersucht.<sup>5, 20, 34, 35, 53, 61</sup>

Für die Östrogenrezeptoren gibt es dagegen nur wenige Veröffentlichungen.<sup>29, 30, 34,</sup>

<sup>41</sup> Die Keratine 5 und 20 wurden vorwiegend im Rahmen der Einteilung in die luminalen bzw. basalen Subgruppen des Urothelkarzinoms analysiert.<sup>11, 17</sup>

Bolenz et al.<sup>5</sup> konnten in der Gruppe der immunhistochemisch Her2-positiven Tumoren ein höheres Rezidivrisiko und eine höhere krankheitsspezifische Mortalität

nachweisen. Eingeschlossen wurden in diese Studie Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom und Patienten mit refraktärem Tumor nach TURB und intravesikaler Immun- und/oder Chemotherapie. Eine neoadjuvante Radio- oder systemische Chemotherapie war ein Ausschlusskriterium dieser Untersuchung.

Fleischmann et al.<sup>20</sup> untersuchten eine Kohorte bestehend aus 150 Patienten mit T1 bis T4 Tumoren, welche keine neoadjuvante Therapie erhalten hatten. Nach Einteilung nach dem Her2-Status mit immunhistochemischen Methoden konnten keine Unterschiede im Outcome festgestellt werden. Allerdings gelang dies nach Analyse der Her2-Amplifikation mit der ebenfalls eingesetzten FISH, wobei eine Überexpression mit schlechterem Überleben einherging.

Krüger et al.<sup>35</sup> untersuchten die Gewebeproben von 138 Patienten mit Hilfe von Immunhistochemie und des HercepTest<sup>®</sup>. Dabei hatten die Patienten mit positivem Her2-Status ein kürzeres krankheitsspezifisches Überleben. Eingeschlossen wurden Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom, eine systemische neoadjuvante Chemotherapie stellte kein Ausschlusskriterium dar.

Soria et al.<sup>53</sup> untersuchten die Gewebeproben von 354 Patienten nach Zystektomie ebenfalls mit Hilfe des HercepTest<sup>®</sup>. Sowohl Patienten mit muskelinvasivem Tumorbefund als auch Patienten mit trotz intravesikaler Chemo- und/oder Immuntherapie refraktärem nicht muskelinvasivem Tumor wurden eingeschlossen. Eine systemische neoadjuvante Therapie war ein Ausschlusskriterium. Es zeigte sich bei den Patienten mit positivem Her2-Status ein vergleichsweise aggressiver Tumor, was sich beispielsweise durch einen höheren Anteil von Lymphknotenmetastasen äußerte. Eine Assoziation mit einem schlechteren Outcome konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Die diskrepanten Ergebnisse veranlassten Zhao et al.<sup>61</sup> zu einer Metaanalyse zur prognostischen Rolle des Her2-Status beim Urothelkarzinom. Darin wurden 9 Studien mit insgesamt 2242 Patienten zusammengefasst, die den Her2-Status mit Hilfe der Immunhistochemie mit oder ohne zusätzliche FISH, teils zusätzlich durch Tissue Mikroarray- Untersuchungen, analysierten. Eingeschlossen wurden Studien von NMIBC und MIBC, die Gewebeproben wurden durch TURB oder Zystektomie gewonnen. Teilweise erhielten die Patienten eine adjuvante Chemotherapie, teils Instillationen im Rahmen der TURB. Patienten mit positivem Her2-Status hatten demnach einen aggressiveren Tumor, was zu höherem Grading und mehr

Lymphknotenmetastasen und letztlich zu einem kürzeren krankheitsspezifischen Überleben führte.

Mit molekularbiologischen Methoden (RT-qPCR) erhoben Kriegmair et al.<sup>34</sup> bei 102 Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom den ERBB 2- Status und konnten für eine hohe Genexpression eine kürzere rezidivfreie Zeit und ein kürzeres Gesamtüberleben nachweisen. Teils erhielten die Patienten eine adjuvante Chemotherapie, eine neoadjuvante Therapie war ein Ausschlusskriterium.

Überlebensanalysen in Bezug auf den Status der Östrogenrezeptoren ESR 1 und ESR 2 beim Urothelkarzinom sind momentan rar. In einer Metaanalyse immunhistochemischer Studien von Ide et al.<sup>29</sup> wurden zwar mehrere Ergebnisse in Bezug auf den Östrogenrezeptorenstatus zusammengefasst, jedoch wurde nur in einer Studie das Outcome mit berücksichtigt.

In dieser Untersuchung von Miyamoto et al.<sup>41</sup> wurde das Tumorgewebe von 188 Patienten mit NMIBC und MIBC immunhistochemisch untersucht, wobei sich für einen positiven ESR 2-Status ein schlechteres krankheitsspezifisches Überleben zeigte, für ESR 1 gab es diesen Zusammenhang nicht.

In oben bereits beschriebener Studie mit Hilfe der RT-qPCR konnten Kriegmair et al.<sup>34</sup> auch den ESR 1- Status erheben. Dabei war ein höheres ESR 1- Genexpressionslevel mit einem schlechteren krankheitsspezifischen Überleben assoziiert.

Insgesamt erscheint die Datenlage für die Östrogenrezeptoren in Bezug auf Auswirkungen auf das Überleben noch verbesserungsbedürftig.

Die Keratine 5 und 20 wurden von mehreren Arbeitsgruppen<sup>9, 11, 12, 16, 40, 48</sup> gemeinsam mit anderen Markern zur Einteilung der Urothelkarzinome in Subgruppen genutzt, dabei diente Keratin 5 als Marker für basale und Keratin 20 für lumbale Tumoren. Mit Hilfe genomweiter Genexpressionsanalysen wurden die Proben großer Patientenkollektive sequenziert, wodurch eine breite Datenbasis entstand und sich Aussagen bezüglich der Aggressivität der Tumoren und der Überlebensdaten ergaben. Dabei konnten bei basalen Tumoren jeweils ein aggressiveres Wachstum und höhere TNM-Stadien gefunden werden. Sowohl das krankheitsspezifische als auch das Gesamtüberleben war in dieser Gruppe schlechter.

Eckstein et al.<sup>17</sup> untersuchten mit molekularbiologischen Methoden (RT-qPCR) die Genexpression von Keratin 5 und Keratin 20 im Gewebe von 122 Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom ohne vorangegangene Chemotherapie. Adjuvant erhielt ein Teil der Patienten eine Chemotherapie. In der Untersuchung war eine hohe KRT 5 und niedrige KRT 20 Expression mit einem besseren krankheitsspezifischen und rezidivfreien Überleben assoziiert.

Grundsätzlich erscheint die Datenlage zur Konkordanz der Genexpression und der Markerassoziation mit dem Outcome der Patienten nicht einheitlich. Die vorgestellten Studien bedienen sich unterschiedlicher Analysemethoden (IHC, FISH, Tissue Microarray, RT-qPCR, Whole-genome-Sequencing) und schließen heterogene Patientenkollektive (NMIBC und MIBC) und Behandlungsmethoden (nur TURB, zusätzlich CX, neoadjuvante und adjuvante Therapien) mit ein. Auch die Kohortengröße unterscheidet sich teils deutlich.

Die verschiedenen Analysemethoden und nicht einheitliche Bewertungsprotokolle führen dazu, dass die so generierten Erkenntnisse nicht gleichgesetzt werden können. In Arbeiten, in denen die Korrelation der Ergebnisse von immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden verglichen wurden, zeigten sich zudem Unterschiede je nach analysiertem Gen,<sup>52, 57</sup> sodass die Daten dieser Untersuchungen nur bedingt verglichen werden können.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Analyse sind besonders in Bezug auf ERBB 2 bedeutsam, da hier die Heterogenität der Genexpression unterstrichen wird und dies für eine Dynamik im Krankheitsverlauf sprechen könnte.

## 6 Zusammenfassung

Neue Untersuchungs- und Therapiemöglichkeiten haben das Potential, die Behandlung des Urothelkarzinoms zu verbessern. Voraussetzung ist, dass die Patienten identifiziert werden können, die von einer solchen Therapie aufgrund der molekularen Eigenschaften des Tumors und klinischer Parameter profitieren. Daher war es Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob die zur Identifikation von besonders aggressiven Tumoren und als Angriffspunkt neuer Therapien in Frage kommenden Gene in verschiedenen zur Verfügung stehenden Tumorgeweben gleichermaßen exprimiert sind.

Dazu wurden die Gewebeproben von 44 Patienten auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time-PCR untersucht und die Ergebnisse mit klinischen, pathologischen und zusätzlich erhobenen Follow-up-Daten verglichen.

Dabei konnte bei der Genexpression von ESR 1 und ESR 2 im Gewebe von TURB, Zystektomie und Lymphknotenmetastase im Median kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. ERBB 2 und Keratin 20 waren im Gewebe der TURB höher exprimiert als im Zystektomiegewebe ( $p=0,0065$  für ERBB 2;  $p=0,03$  für KRT 20), im TURB-Gewebe zeigte sich zudem für ERBB 2 und Keratin 5 eine höhere Genexpression als im Lymphknotengewebe ( $p=0,04$  für ERBB 2,  $p=0,02$  für KRT 5).

Die Korrelation der Genexpressionshöhe ist, bis auf wenige Ausnahmen (n.s. für ESR 1: CX zu LK; ESR 2: TURB zu LK und CX zu LK; Keratin 20: CX zu LK), statistisch nachweisbar ( $p$ -Werte der signifikanten Ergebnisse zwischen 0,03 und  $<0,0001$ ) und erreichte hohe Spearman Korrelationseffizienten ( $\rho$ -Werte maximal 0,83). Eine Assoziation mit dem Gesamtüberleben konnte für ESR 1, ESR 2, ERBB 2 und Keratin 20 im Gewebe von TURB bzw. Zystektomie nachgewiesen werden. Mit dem krankheitsspezifischen Überleben waren ESR 2, ERBB 2 und Keratin 5 in unterschiedlichen Geweben assoziiert.

Damit zeigt diese Arbeit, dass verschiedene Tumorgewebe zur molekularen mRNA basierten Analytik verwendet werden können. Trotz teilweise guter Korrelation und Konkordanz gab es Unterschiede in der Expression der subtyp-spezifischen Gene und Targets wie ERBB 2, sodass diese Unterschiede die erneute Analyse einer Metastase im Krankheitsverlauf unterstützen. Weitere Forschung ist zur Validierung

und mit dem Ziel nötig, die diagnostischen und therapeutischen Verfahren weiter zu verbessern.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Aurilio, G, Disalvatore, D, Pruneri, G, Bagnardi, V, Viale, G, Curigliano, G, Adamoli, L, Munzone, E, Sciandivasci, A, De Vita, F, Goldhirsch, A, Nole, F: A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer*, 50: 277-289, 2014.
2. Bellmunt, J, Werner, L, Bamias, A, Fay, AP, Park, RS, Riestler, M, Selvarajah, S, Barletta, JA, Berman, DM, de Muga, S, Salido, M, Gallardo, E, Rojo, F, Guancial, EA, Bambury, R, Mullane, SA, Choueiri, TK, Loda, M, Stack, E, Rosenberg, J: HER2 as a target in invasive urothelial carcinoma. *Cancer Med*, 4: 844-852, 2015.
3. BioNTech Diagnostics GmbH: MammaTyper Gebrauchsinformation Version 3.0. In, 2015.
4. Bolenz, C: Urothelkarzinom der Harnblase: Chirurgische Therapie. In: *Die Urologie*. edited by MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W., JANETSCHEK, G., WIRTH, M., Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp 735-749.
5. 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.
6. Brennan, P, Bogillot, O, Cordier, S, Greiser, E, Schill, W, Vineis, P, Lopez-Abente, G, Tzonou, A, Chang-Claude, J, Bolm-Audorff, U, Jockel, KH, Donato, F, Serra, C, Wahrendorf, J, Hours, M, T'Mannetje, A, Kogevinas, M, Boffetta, P: Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*, 86: 289-294, 2000.
7. Breyer, J, Wirtz, RM, Laible, M, Schlombs, K, Erben, P, Kriegmair, MC, Stoehr, R, Eidt, S, Denzinger, S, Burger, M, Hartmann, A, Otto, W: ESR1, ERBB2, and Ki67 mRNA expression predicts stage and grade of non-muscle-invasive bladder carcinoma (NMIBC). *Virchows Archiv*: 1-6, 2016.
8. Cancer Genome Atlas, N: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490: 61-70, 2012.
9. Cancer Genome Atlas, N: Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507: 315-322, 2014.
10. Carneiro, BA, Meeks, JJ, Kuzel, TM, Scaranti, M, Abdulkadir, SA, Giles, FJ: Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treat Rev*, 41: 170-178, 2015.
11. Choi, W, Czerniak, B, Ochoa, A, Su, X, Siefker-Radtke, A, Dinney, C, McConkey, DJ: Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*, 11: 400-410, 2014.
12. Choi, W, Porten, S, Kim, S, Willis, D, Plimack, Elizabeth R, Hoffman-Censits, J, Roth, B, Cheng, T, Tran, M, Lee, IL, Melquist, J, Bondaruk, J, Majewski, T, Zhang, S, Pretzsch, S, Baggerly, K, Siefker-Radtke, A, Czerniak, B, Dinney, Colin PN, McConkey, David J: Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell*, 25: 152-165, 2014.
13. Comperat, E, Varinot, J: Immunochemical and molecular assessment of urothelial neoplasms and aspects of the 2016 World Health Organization classification. *Histopathology*, 69: 717-726, 2016.

14. Cote, RJ, Datar, RH: Therapeutic approaches to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 46: 67-83, 2003.
15. Dadhania, V, Zhang, M, Zhang, L, Bondaruk, J, Majewski, T, Siefker-Radtke, A, Guo, CC, Dinney, C, Cogdell, DE, Zhang, S, Lee, S, Lee, JG, Weinstein, JN, Baggerly, K, McConkey, D, Czerniak, B: 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.
16. Damrauer, JS, Hoadley, KA, Chism, DD, Fan, C, Tiganelli, CJ, Wobker, SE, Yeh, JJ, Milowsky, MI, Iyer, G, Parker, JS, Kim, WY: Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 3110-3115, 2014.
17. Eckstein, M, Wirtz, RM, Gross-Weege, M, Breyer, J, Otto, W, Stoehr, R, Sikic, D, Keck, B, Eidt, S, Burger, M, Bolenz, C, Nitschke, K, Proubsky, S, Hartmann, A, Erben, P: mRNA-Expression of KRT5 and KRT20 Defines Distinct Prognostic Subgroups of Muscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer Correlating with Histological Variants. *International journal of molecular sciences*, 19, 2018.
18. Fernández, MI: Urothelkarzinom der Harnblase: Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren. In: *Die Urologie*. edited by MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W., JANETSCHEK, G., WIRTH, M., Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp 695-702.
19. Fernández, MI, Schultz, M: Urothelkarzinom der Harnblase: Klassifikation. In: *Die Urologie*. edited by MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W., JANETSCHEK, G., WIRTH, M., Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp 703-710.
20. 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. *Eur Urol*, 60: 350-357, 2011.
21. Gakis, G, Stenzl, A: *Molekulare Marker beim high-grade Harnblasenkarzinom : diagnostisch - prognostisch - prädiktiv*, Berlin, Heidelberg, Springer, 2016.
22. Gardmark, T, Wester, K, De la Torre, M, Carlsson, J, Malmstrom, PU: Analysis of HER2 expression in primary urinary bladder carcinoma and corresponding metastases. *BJU international*, 95: 982-986, 2005.
23. Ghosh, M, Brancato, SJ, Agarwal, PK, Apolo, AB: Targeted therapies in urothelial carcinoma. *Curr Opin Oncol*, 26: 305-320, 2014.
24. Godoy, G, Gakis, G, Smith, CL, Fahmy, O: Effects of Androgen and Estrogen Receptor Signaling Pathways on Bladder Cancer Initiation and Progression. *Bladder Cancer*, 2: 127-137, 2016.
25. Hartmann, K, Schlombs, K, Laible, M, Gurtler, C, Schmidt, M, Sahin, U, Lehr, HA: Robustness of biomarker determination in breast cancer by RT-qPCR: impact of tumor cell content, DCIS and non-neoplastic breast tissue. *Diagnostic pathology*, 13: 83, 2018.
26. Heinzlbecker, J: Urothelkarzinom der Harnblase: Tumornachsorge. In: *Die Urologie*. edited by MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W., JANETSCHEK, G., WIRTH, M., Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp 773-778.
27. Hsu, I, Vitkus, S, Da, J, Yeh, S: Role of oestrogen receptors in bladder cancer development. *Nat Rev Urol*, 10: 317-326, 2013.
28. Humphrey, PA, Moch, H, Cubilla, AL, Ulbright, TM, Reuter, VE: The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 70: 106-119, 2016.

29. Ide, H, Inoue, S, Miyamoto, H: Histopathological and prognostic significance of the expression of sex hormone receptors in bladder cancer: A meta-analysis of immunohistochemical studies. *PLoS One*, 12: e0174746, 2017.
30. Ide, H, Miyamoto, H: Steroid Hormone Receptor Signals as Prognosticators for Urothelial Tumor. *Dis Markers*, 2015: 840640, 2015.
31. Jiang, J, Ulbright, TM, Younger, C, Sanchez, K, Bostwick, DG, Koch, MO, Eble, JN, Cheng, L: Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 125: 921-923, 2001.
32. Jimenez, RE, Hussain, M, Bianco, FJ, Jr., Vaishampayan, U, Tabazcka, P, Sakr, WA, Pontes, JE, Wood, DP, Jr., Grignon, DJ: Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res*, 7: 2440-2447, 2001.
33. Kamat, AM, Hahn, NM, Efsthathiou, JA, Lerner, SP, Malmström, PU, Choi, W, Guo, CC, Lotan, Y, Kassouf, W: Bladder cancer. *Lancet*, 388: 2796-2810, 2016.
34. Kriegmair, MC, Wirtz, RM, Worst, TS, Breyer, J, Ritter, M, Keck, B, Boehmer, C, Otto, W, Eckstein, M, Weis, CA, Hartmann, A, Bolenz, C, Erben, P: Prognostic Value of Molecular Breast Cancer Subtypes based on Her2, ESR1, PGR and Ki67 mRNA-Expression in Muscle Invasive Bladder Cancer. *Transl Oncol*, 11: 467-476, 2018.
35. Kruger, S, Weitsch, G, Buttner, H, Matthiensen, A, Bohmer, T, Marquardt, T, Sayk, F, Feller, AC, Bohle, A: HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer*, 102: 514-518, 2002.
36. Laible, M, Schlombs, K, Kaiser, K, Veltrup, E, Herlein, S, Lakis, S, Stöhr, R, Eidt, S, Hartmann, A, Wirtz, RM, Sahin, U: Technical validation of an RT-qPCR in vitro diagnostic test system for the determination of breast cancer molecular subtypes by quantification of ERBB2, ESR1, PGR and MKI67 mRNA levels from formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer*, 16: 398, 2016.
37. Leitlinienprogramm Onkologie: *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms*. 2016. Online: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>, Stand: 26.01.2017.
38. Livak, KJ, Schmittgen, TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif)*, 25: 402-408, 2001.
39. Martini, T: Urothelkarzinom der Harnblase: Diagnostik. In: *Die Urologie*. edited by MICHEL, M. S., THÜROFF, J. W., JANETSCHEK, G., WIRTH, M., Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp 711-719.
40. McConkey, DJ, Choi, W, Dinney, CP: Genetic subtypes of invasive bladder cancer. *Curr Opin Urol*, 25: 449-458, 2015.
41. Miyamoto, H, Yao, JL, Chaux, A, Zheng, Y, Hsu, I, Izumi, K, Chang, C, Messing, EM, Netto, GJ, Yeh, S: Expression of androgen and oestrogen receptors and its prognostic significance in urothelial neoplasm of the urinary bladder. *BJU international*, 109: 1716-1726, 2012.
42. Moll, R, Lowe, A, Laufer, J, Franke, WW: Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, 140: 427-447, 1992.

43. Netto, GJ: Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? *Nat Rev Urol*, 9: 41-51, 2012.
44. Netto, GJ, Tafe, LJ: Emerging Bladder Cancer Biomarkers and Targets of Therapy. *Urol Clin North Am*, 43: 63-76, 2016.
45. Reis-Filho, JS, Simpson, PT, Martins, A, Preto, A, Gartner, F, Schmitt, FC: Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch*, 443: 122-132, 2003.
46. Robert Koch-Institut: *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland*. 2016. Online: [www.krebsdaten.de/krebsbericht](http://www.krebsdaten.de/krebsbericht), Stand: 6.2.2017.
47. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Kaatsch, P, Spix, C, Katalinic, A, Hentschel, S, Luttmann, S, Stegmaier, C: *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015. Online: [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2015/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile), Stand: 31.01.2017.
48. Robertson, AG, Kim, J, Al-Ahmadie, H, Bellmunt, J, Guo, G, Cherniack, AD, Hinoue, T, Laird, PW, Hoadley, KA, Akbani, R, Castro, MAA, Gibb, EA, Kanchi, RS, Gordenin, DA, Shukla, SA, Sanchez-Vega, F, Hansel, DE, Czerniak, BA, Reuter, VE, Su, X, de Sa Carvalho, B, Chagas, VS, Mungall, KL, Sadeghi, S, Pedamallu, CS, Lu, Y, Klimczak, LJ, Zhang, J, Choo, C, Ojesina, AI, Bullman, S, Leraas, KM, Lichtenberg, TM, Wu, CJ, Schultz, N, Getz, G, Meyerson, M, Mills, GB, McConkey, DJ, Network, TR, Weinstein, JN, Kwiatkowski, DJ, Lerner, SP: Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171: 540-556 e525, 2017.
49. Rossi, S, Basso, M, Strippoli, A, Dadduzio, V, Cerchiaro, E, Barile, R, D'Argento, E, Cassano, A, Schinzari, G, Barone, C: Hormone Receptor Status and HER2 Expression in Primary Breast Cancer Compared With Synchronous Axillary Metastases or Recurrent Metastatic Disease. *Clinical breast cancer*, 15: 307-312, 2015.
50. Shen, SS, Smith, CL, Hsieh, JT, Yu, J, Kim, IY, Jian, W, Sonpavde, G, Ayala, GE, Younes, M, Lerner, SP: Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in bladder cancer cell lines and human bladder tumor tissue. *Cancer*, 106: 2610-2616, 2006.
51. Shephard, EA, Stapley, S, Neal, RD, Rose, P, Walter, FM, Hamilton, WT: Clinical features of bladder cancer in primary care. *Br J Gen Pract*, 62: e598-604, 2012.
52. Sinn, HP, Schneeweiss, A, Keller, M, Schlombs, K, Laible, M, Seitz, J, Lakis, S, Veltrup, E, Altevogt, P, Eidt, S, Wirtz, RM, Marme, F: Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. *BMC Cancer*, 17: 124, 2017.
53. Soria, F, Moschini, M, Haitel, A, Wirth, GJ, Gust, KM, Briganti, A, Roupert, M, Klatter, T, Hassler, MR, Karakiewicz, PI, Shariat, SF: The effect of HER2 status on oncological outcomes of patients with invasive bladder cancer. *Urol Oncol*, 34: 533 e531-533 e510, 2016.
54. Sui, W, Matulay, JT, James, MB, Onyeji, IC, Theofanides, MC, RoyChoudhury, A, DeCastro, GJ, Wenske, S: Micropapillary Bladder Cancer: Insights from the National Cancer Database. *Bladder Cancer*, 2: 415-423, 2016.
55. Sylvester, RJ, van der Meijden, AP, Oosterlinck, W, Witjes, JA, Bouffieux, C, Denis, L, Newling, DW, Kurth, K: Predicting recurrence and progression in

- individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 49: 466-465; discussion 475-467, 2006.
56. Wirtz, RM, Fritz, V, Stöhr, R, Hartmann, A: [Molecular classification of bladder cancer : Possible similarities to breast cancer]. *Pathologe*, 37: 52-60, 2016.
57. Wirtz, RM, Sihto, H, Isola, J, Heikkila, P, Kellokumpu-Lehtinen, PL, Auvinen, P, Turpeenniemi-Hujanen, T, Jyrkkio, S, Lakis, S, Schlombs, K, Laible, M, Weber, S, Eidt, S, Sahin, U, Joensuu, H: Biological subtyping of early breast cancer: a study comparing RT-qPCR with immunohistochemistry. *Breast Cancer Res Treat*, 157: 437-446, 2016.
58. Wockel, A, Festl, J, Stuber, T, Brust, K, Krockenberger, M, Heuschmann, PU, Jiru-Hillmann, S, Albert, US, Budach, W, Follmann, M, Janni, W, Kopp, I, Kreienberg, R, Kuhn, T, Langer, T, Nothacker, M, Scharl, A, Schreer, I, Link, H, Engel, J, Fehm, T, Weis, J, Welt, A, Steckelberg, A, Feyer, P, König, K, Hahne, A, Baumgartner, T, Kreipe, HH, Knoefel, WT, Denkinger, M, Brucker, S, Luftner, D, Kubisch, C, Gerlach, C, Lebeau, A, Siedentopf, F, Petersen, C, Bartsch, HH, Schulz-Wendtland, R, Hahn, M, Hanf, V, Müller-Schimpfle, M, Henschler, U, Roncarati, R, Katalinic, A, Heitmann, C, Honegger, C, Paradies, K, Bjelic-Radisic, V, Degenhardt, F, Wenz, F, Rick, O, Holzels, D, Zaiss, M, Kemper, G, Budach, V, Denkert, C, Gerber, B, Tesch, H, Hirschmüller, S, Sinn, HP, Dunst, J, Munstedt, K, Bick, U, Fallenberg, E, Tholen, R, Hung, R, Baumann, F, Beckmann, MW, Blohmer, J, Fasching, P, Lux, MP, Harbeck, N, Hadji, P, Hauner, H, Heywang-Kobrunner, S, Huober, J, Hubner, J, Jackisch, C, Loibl, S, Luck, HJ, von Minckwitz, G, Mobus, V, Müller, V, Nothlings, U, Schmidt, M, Schmutzler, R, Schneeweiss, A, Schutz, F, Stickeler, E, Thomssen, C, Untch, M, Wesselmann, S, Bucker, A, Buck, A, Stangl, S: Interdisciplinary Screening, Diagnosis, Therapy and Follow-up of Breast Cancer. Guideline of the DGGG and the DKG (S3-Level, AWMF Registry Number 032/045OL, December 2017) - Part 2 with Recommendations for the Therapy of Primary, Recurrent and Advanced Breast Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 78: 1056-1088, 2018.
59. Yao, Z-x, Lu, L-j, Wang, R-j, Jin, L-b, Liu, S-c, Li, H-y, Ren, G-s, Wu, K-n, Wang, D-l, Kong, L-q: Discordance and clinical significance of ER, PR, and HER2 status between primary breast cancer and synchronous axillary lymph node metastasis. *Medical Oncology*, 31: 798, 2013.
60. Yeung, C, Hilton, J, Clemons, M, Mazzaello, S, Hutton, B, Haggard, F, Addison, CL, Kuchuk, I, Zhu, X, Gelmon, K, Arnaout, A: Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours-a review. *Cancer metastasis reviews*, 35: 427-437, 2016.
61. 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. *Int Urol Nephrol*, 47: 87-94, 2015.

## 8 Anhang

### 8.1 Einfluss von Berechnung und Referenzgen auf die Genexpression

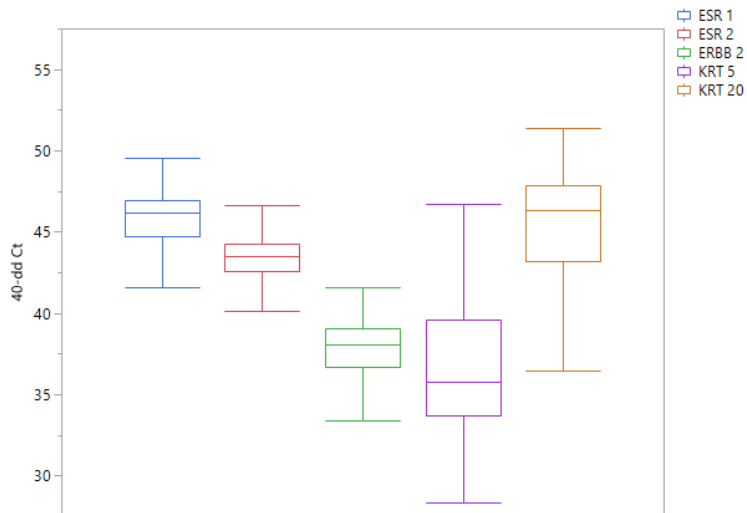


Abbildung 10: Genexpression aller Gewebe mit CALM als Referenzgen, mit Formel 1 berechnet

Tabelle 6: Genexpression aller Gewebe mit CALM als Referenzgen, mit Formel 1 berechnet

| Gen           | Minimum | Maximum | Median | Standardabweichung |
|---------------|---------|---------|--------|--------------------|
| <b>ESR 1</b>  | 41,61   | 49,54   | 46,14  | 1,46               |
| <b>ESR 2</b>  | 39,45   | 47,59   | 43,50  | 1,51               |
| <b>ERBB 2</b> | 32,49   | 41,61   | 38,06  | 1,84               |
| <b>KRT 5</b>  | 24,05   | 46,69   | 35,75  | 4,59               |
| <b>KRT 20</b> | 35,06   | 51,39   | 46,30  | 4,02               |

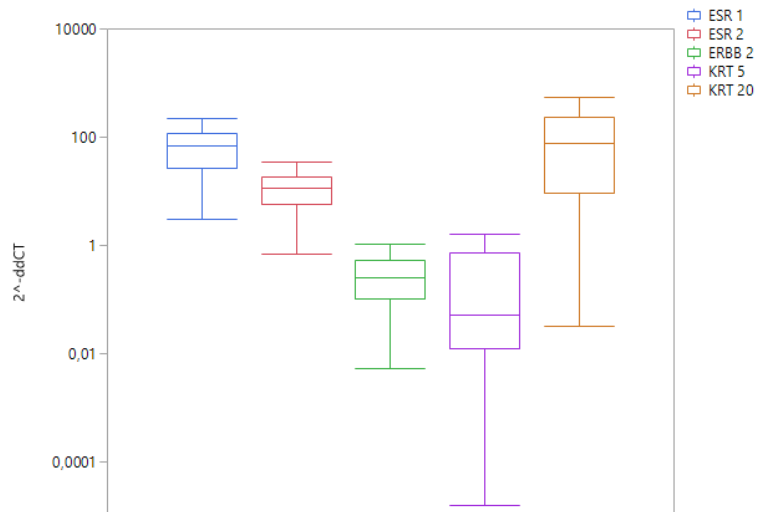


Abbildung 11: Genexpression aller Gewebe mit CALM als Referenzgen, mit Formel 2 berechnet

Tabelle 7: Genexpression aller Gewebe mit CALM als Referenzgen, mit Formel 2 berechnet

| Gen    | Minimum<br>Maximum              | Median | Standardabweichung |
|--------|---------------------------------|--------|--------------------|
| ESR 1  | 3,06<br>743,14                  | 70,74  | 108,34             |
| ESR 2  | 0,68<br>192,53                  | 11,32  | 26,20              |
| ERBB 2 | 0,01<br>3,04                    | 0,26   | 0,54               |
| KRT 5  | $1,57 \times 10^{-5}$<br>103,16 | 0,05   | 14,04              |
| KRT 20 | 0,03<br>2680,58                 | 79,08  | 364,88             |

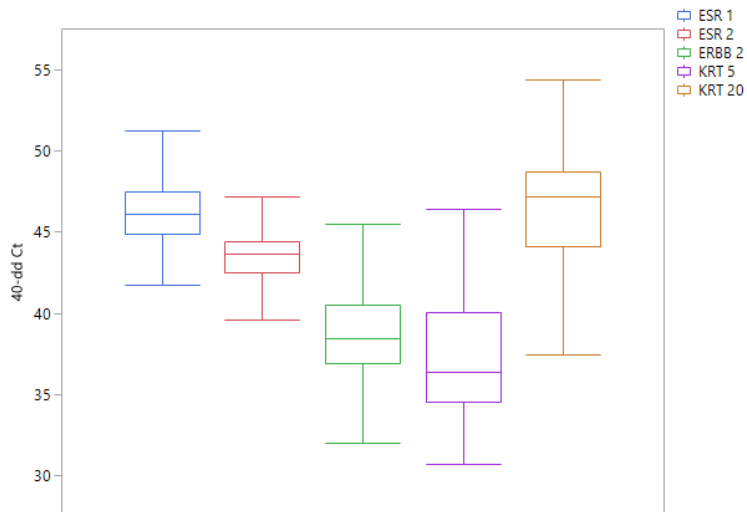


Abbildung 12: Genexpression aller Gewebe mit RPL als Referenzgen, mit Formel 1 berechnet

Tabelle 8: Genexpression aller Gewebe mit RPL als Referenzgen, mit Formel 1 berechnet

| Gen    | Minimum<br>Maximum | Median | Standardabweichung |
|--------|--------------------|--------|--------------------|
| ESR 1  | 41,76<br>63,24     | 46,11  | 2,82               |
| ESR 2  | 39,62<br>53,04     | 43,63  | 2,33               |
| ERBB 2 | 32,01<br>46,80     | 38,46  | 2,59               |
| KRT 5  | 30,73<br>46,41     | 36,38  | 3,96               |
| KRT 20 | 34,28<br>54,38     | 47,17  | 4,16               |



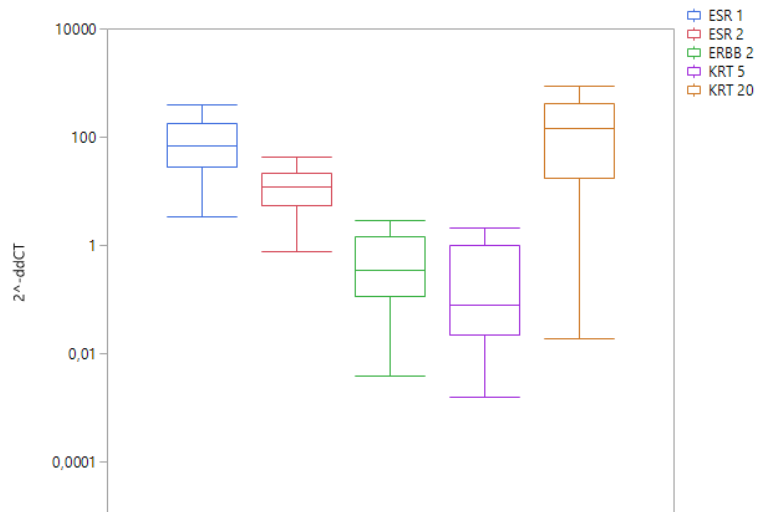


Abbildung 13: Genexpression aller Gewebe mit RPL als Referenzgen, mit Formel 2 berechnet

Tabelle 9: Genexpression aller Gewebe mit RPL als Referenzgen, mit Formel 2 berechnet

| Gen           | Minimum<br>Maximum | Median | Standardabweichung |
|---------------|--------------------|--------|--------------------|
| <b>ESR 1</b>  | 3,39<br>9908205,86 | 69,19  | 912052,08          |
| <b>ESR 2</b>  | 0,76<br>8442,02    | 12,35  | 1156,84            |
| <b>ERBB 2</b> | 0,003<br>111,23    | 0,34   | 12,49              |
| <b>KRT 5</b>  | 0,001<br>84,79     | 0,08   | 13,07              |
| <b>KRT 20</b> | 0,02<br>21388,99   | 144,10 | 2631,68            |

## 8.1.1 Mit Formel 1 berechnet

Tabelle 10: Genexpression aller Gene in allen Geweben mit CALM als Referenzgen, mit Formel 1 berechnet

| Gen           | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standardabweichung |
|---------------|--------|--------------------|--------|--------------------|
| <b>ESR 1</b>  | TURB   | 41,61<br>48,61     | 45,52  | 1,62               |
|               | CX     | 42,52<br>49,22     | 46,00  | 1,48               |
|               | LK     | 43,30<br>49,54     | 46,28  | 1,32               |
| <b>ESR 2</b>  | TURB   | 41,39<br>43,53     | 43,15  | 1,21               |
|               | CX     | 39,45<br>47,59     | 43,47  | 1,75               |
|               | LK     | 40,38<br>46,64     | 43,86  | 1,44               |
| <b>ERBB 2</b> | TURB   | 36,20<br>40,95     | 38,69  | 1,40               |
|               | CX     | 33,36<br>41,04     | 37,74  | 1,77               |
|               | LK     | 32,49<br>41,61     | 38,03  | 2,07               |
| <b>KRT 5</b>  | TURB   | 30,18<br>46,15     | 37,05  | 4,34               |
|               | CX     | 28,33<br>46,69     | 36,50  | 4,64               |
|               | LK     | 24,05<br>45,80     | 34,78  | 4,51               |
| <b>KRT 20</b> | TURB   | 37,48<br>50,02     | 46,69  | 3,17               |
|               | CX     | 35,20<br>49,84     | 44,82  | 3,95               |
|               | LK     | 35,06<br>51,39     | 45,74  | 4,46               |

Tabelle 11: Genexpression aller Gene in allen Geweben mit RPL als Referenzgen, mit Formel 1 berechnet

| Gen    | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standardabweichung |
|--------|--------|--------------------|--------|--------------------|
| ESR 1  | TURB   | 41,76<br>53,40     | 46,04  | 2,20               |
|        | CX     | 42,35<br>54,28     | 46,10  | 2,30               |
|        | LK     | 42,87<br>63,24     | 46,30  | 3,57               |
| ESR 2  | TURB   | 41,39<br>43,53     | 43,15  | 1,21               |
|        | CX     | 39,61<br>52,64     | 43,63  | 2,44               |
|        | LK     | 40,22<br>52,64     | 43,51  | 2,44               |
| ERBB 2 | TURB   | 36,55<br>46,80     | 39,03  | 2,42               |
|        | CX     | 34,75<br>45,45     | 38,28  | 2,51               |
|        | LK     | 32,01<br>45,48     | 37,68  | 2,70               |
| KRT 5  | TURB   | 33,56<br>46,41     | 37,64  | 3,79               |
|        | CX     | 31,77<br>43,41     | 37,08  | 3,88               |
|        | LK     | 30,73<br>46,00     | 34,98  | 3,70               |
| KRT 20 | TURB   | 36,70<br>54,38     | 48,09  | 3,39               |
|        | CX     | 35,91<br>51,96     | 46,72  | 3,75               |
|        | LK     | 34,28<br>54,00     | 46,65  | 4,83               |

## 8.1.2 Mit Formel 2 berechnet

Tabelle 12: Genexpression aller Gene in allen Geweben mit CALM als Referenzgen, mit Formel 2 berechnet

| Gen           | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standardabweichung |
|---------------|--------|--------------------|--------|--------------------|
| <b>ESR 1</b>  | TURB   | 3,06<br>390,50     | 45,82  | 87,75              |
|               | CX     | 5,73<br>597,41     | 63,88  | 108,79             |
|               | LK     | 9,82<br>743,14     | 77,62  | 121,10             |
| <b>ESR 2</b>  | TURB   | 2,62<br>92,50      | 8,88   | 22,29              |
|               | CX     | 0,68<br>192,53     | 11,12  | 33,84              |
|               | LK     | 1,30<br>99,77      | 14,54  | 19,58              |
| <b>ERBB 2</b> | TURB   | 0,07<br>1,93       | 0,40   | 0,53               |
|               | CX     | 0,01<br>2,05       | 0,21   | 0,41               |
|               | LK     | 0,01<br>3,04       | 0,25   | 0,63               |
| <b>KRT 5</b>  | TURB   | 0,001<br>71,24     | 0,13   | 15,70              |
|               | CX     | 0,0003<br>103,16   | 0,09   | 16,71              |
|               | LK     | 0,00001<br>55,77   | 0,03   | 9,24               |
| <b>KRT 20</b> | TURB   | 0,17<br>1038,81    | 103,31 | 328,88             |
|               | CX     | 0,04<br>913,72     | 29,51  | 201,57             |
|               | LK     | 0,03<br>2680,58    | 54,65  | 483,61             |

Tabelle 13: Genexpression aller Gene in allen Geweben mit RPL als Referenzgen, mit Formel 2 berechnet

| Gen           | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standardabweichung |
|---------------|--------|--------------------|--------|--------------------|
| <b>ESR 1</b>  | TURB   | 3,39<br>10779,44   | 65,90  | 1952,51            |
|               | CX     | 5,11<br>19858,93   | 68,40  | 3037,78            |
|               | LK     | 7,29<br>9908205,86 | 78,97  | 1493530,9          |
| <b>ESR 2</b>  | TURB   | 3,51<br>8442,02    | 12,98  | 1538,10            |
|               | CX     | 0,76<br>6400,08    | 12,35  | 972,84             |
|               | LK     | 1,16<br>6381,07    | 11,39  | 1035,74            |
| <b>ERBB 2</b> | TURB   | 0,09<br>111,23     | 0,51   | 20,93              |
|               | CX     | 0,03<br>43,77      | 0,31   | 7,52               |
|               | LK     | 0,003<br>44,53     | 0,20   | 7,48               |
| <b>KRT 5</b>  | TURB   | 0,01<br>84,79      | 0,20   | 20,70              |
|               | CX     | 0,003<br>33,97     | 0,13   | 7,96               |
|               | LK     | 0,001<br>63,98     | 0,30   | 9,90               |
| <b>KRT 20</b> | TURB   | 0,10<br>21388,99   | 271,66 | 4072,07            |
|               | CX     | 0,06<br>3971,59    | 106,43 | 638,11             |
|               | LK     | 0,02<br>16388,27   | 103,21 | 2586,34            |

## 8.1.3 Unterschiede in der Genexpression zwischen den Präparaten

Tabelle 14: ESR 1 nach Gewebeprobe

| Gen   | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standard-<br>abweichung | p-Werte                          |
|-------|--------|--------------------|--------|-------------------------|----------------------------------|
| ESR 1 | TURB   | 41,61              | 45,52  | 1,62                    | } p=0,79<br>} p=0,19<br>} p=0,15 |
|       |        | 48,61              |        |                         |                                  |
|       | CX     | 42,52              | 46,00  | 1,48                    |                                  |
|       |        | 49,22              |        |                         |                                  |
|       | LK     | 43,30              | 46,28  | 1,32                    |                                  |
|       |        | 49,54              |        |                         |                                  |

Tabelle 15: ESR 2 nach Gewebeprobe

| Gen   | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standard-<br>abweichung | p-Werte                          |
|-------|--------|--------------------|--------|-------------------------|----------------------------------|
| ESR 2 | TURB   | 41,39              | 43,15  | 1,21                    | } p=0,37<br>} p=0,22<br>} p=0,76 |
|       |        | 43,53              |        |                         |                                  |
|       | CX     | 39,45              | 43,47  | 1,75                    |                                  |
|       |        | 47,59              |        |                         |                                  |
|       | LK     | 40,38              | 43,86  | 1,44                    |                                  |
|       |        | 46,64              |        |                         |                                  |

Tabelle 16: ERBB 2 nach Gewebeprobe

| Gen    | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standard-<br>abweichung | p-Werte                            |
|--------|--------|--------------------|--------|-------------------------|------------------------------------|
| ERBB 2 | TURB   | 36,20              | 38,69  | 1,40                    | } p=0,0065<br>} p=0,64<br>} p=0,04 |
|        |        | 40,95              |        |                         |                                    |
|        | CX     | 33,36              | 37,74  | 1,77                    |                                    |
|        |        | 41,04              |        |                         |                                    |
|        | LK     | 32,49              | 38,03  | 2,07                    |                                    |
|        |        | 41,61              |        |                         |                                    |

Tabelle 17: Keratin 5 nach Gewebeprobe

| Gen   | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standard-<br>abweichung | p-Werte    |
|-------|--------|--------------------|--------|-------------------------|------------|
| KRT 5 | TURB   | 30,18<br>46,15     | 37,05  | 4,34                    | } p=0,46   |
|       | CX     | 28,33<br>46,69     | 36,50  | 4,64                    |            |
|       | LK     | 24,05<br>45,80     | 34,78  | 4,51                    | } p=0,09   |
|       |        |                    |        |                         | } p=0,0225 |

Tabelle 18: Keratin 20 nach Gewebeprobe

| Gen    | Gewebe | Minimum<br>Maximum | Median | Standard-<br>abweichung | p-Werte    |
|--------|--------|--------------------|--------|-------------------------|------------|
| KRT 20 | TURB   | 37,48<br>50,02     | 46,69  | 3,17                    | } p=0,0317 |
|        | CX     | 35,20<br>49,84     | 44,82  | 3,95                    |            |
|        | LK     | 35,06<br>51,39     | 45,74  | 4,46                    | } p=0,55   |
|        |        |                    |        |                         | } p=0,17   |

## 8.2 Genexpression nach Geschlecht

Tabelle 19: Genexpressionswerte nach Geschlecht

| Gewebe | Gen    | Weiblich |         | Männlich |         | p-Wert |
|--------|--------|----------|---------|----------|---------|--------|
|        |        | Median   | Minimum | Median   | Minimum |        |
| TURB   | ESR 1  | 45,89    | 45,41   | 45,50    | 41,61   | 0,67   |
|        |        |          | 46,64   |          | 48,61   |        |
|        | ESR 2  | 42,97    | 42,61   | 43,23    | 41,39   | 0,88   |
|        |        |          | 43,81   |          | 46,53   |        |
|        | ERBB 2 | 38,31    | 36,55   | 38,69    | 36,20   | 0,86   |
|        |        | 40,28    |         | 40,95    |         |        |
| KRT 5  | 41,43  | 34,80    | 36,60   | 30,18    | 0,54    |        |
|        |        | 45,59    |         | 46,15    |         |        |
| KRT 20 | 46,69  | 41,58    | 46,59   | 37,48    | 0,69    |        |
|        |        | 48,06    |         | 50,02    |         |        |
| CX     | ESR 1  | 46,26    | 45,45   | 45,52    | 42,52   | 0,71   |
|        |        |          | 47,80   |          | 49,22   |        |
|        | ESR 2  | 44,16    | 43,47   | 42,84    | 39,45   | 0,46   |
|        |        |          | 45,12   |          | 47,59   |        |
|        | ERBB 2 | 37,24    | 34,83   | 37,76    | 33,36   | 0,67   |
|        |        | 41,04    |         | 40,30    |         |        |
| KRT 5  | 37,30  | 35,95    | 35,59   | 28,33    | 0,13    |        |
|        |        | 44,98    |         | 46,69    |         |        |
| KRT 20 | 45,30  | 36,84    | 44,82   | 35,20    | 0,65    |        |
|        |        | 48,32    |         | 49,84    |         |        |
| LK     | ESR 1  | 46,29    | 43,30   | 46,26    | 43,67   | 0,19   |
|        |        |          | 47,10   |          | 49,54   |        |
|        | ESR 2  | 44,20    | 42,07   | 43,84    | 40,38   | 0,11   |
|        |        |          | 44,52   |          | 46,64   |        |
|        | ERBB 2 | 37,98    | 34,05   | 38,03    | 32,49   | 0,46   |
|        |        | 40,73    |         | 41,61    |         |        |
| KRT 5  | 34,37  | 33,42    | 34,84   | 24,05    | 0,30    |        |
|        |        | 44,28    |         | 45,80    |         |        |
| KRT 20 | 46,07  | 37,84    | 45,19   | 35,06    | 0,95    |        |
|        |        | 51,39    |         | 50,14    |         |        |



### 8.3 Genexpression nach T-Stadium

*Tabelle 20: Vergleich der Genexpression Stadium T2/T3 gegen T4*

| <b>Gen</b>    | <b>Gewebe</b> | <b>p-Wert</b> |
|---------------|---------------|---------------|
| <b>ESR 1</b>  | CX            | 0,51          |
|               | LK            | 0,09          |
| <b>ESR 2</b>  | CX            | 0,71          |
|               | LK            | 0,53          |
| <b>ERBB 2</b> | CX            | 0,09          |
|               | LK            | 0,07          |
| <b>KRT 5</b>  | CX            | 0,11          |
|               | LK            | 0,83          |
| <b>KRT 20</b> | CX            | 0,75          |
|               | LK            | 0,67          |

## 8.4 Genexpression in Abhängigkeit des Tumoranteils des FFPE-Gewebeschnitts

Tabelle 21: Genexpression, je nach Tumoranteil des untersuchten Gewebes

| Gewebe      | Gen    | Median <50% | Minimum<br>Maximum | Median >50% | Minimum<br>Maximum | p-Wert |
|-------------|--------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|--------|
| <b>TURB</b> | ESR 1  | 45,75       | 43,16<br>47,18     | 45,50       | 41,61<br>48,61     | 0,86   |
|             | ESR 2  | 42,77       | 42,09<br>44,06     | 43,23       | 41,39<br>46,53     | 0,17   |
|             | ERBB 2 | 38,67       | 34,34<br>40,95     | 38,90       | 36,20<br>40,90     | 0,79   |
|             | KRT 5  | 35,59       | 32,14<br>44,46     | 37,47       | 30,18<br>43,97     | 0,55   |
|             | KRT 20 | 46,38       | 45,28<br>48,36     | 46,75       | 37,48<br>50,02     | 0,63   |
| <b>CX</b>   | ESR 1  | 46,21       | 44,61<br>48,48     | 45,01       | 42,52<br>49,22     | 0,14   |
|             | ESR 2  | 43,64       | 41,49<br>46,91     | 42,59       | 39,45<br>47,59     | 0,07   |
|             | ERBB 2 | 37,74       | 33,36<br>41,04     | 37,24       | 34,32<br>40,30     | 0,90   |
|             | KRT 5  | 37,10       | 28,33<br>44,98     | 35,35       | 29,26<br>46,69     | 0,73   |
|             | KRT 20 | 44,82       | 38,37<br>48,32     | 43,66       | 35,20<br>49,49     | 0,23   |
| <b>LK</b>   | ESR 1  | 46,19       | 43,94<br>49,54     | 46,62       | 43,67<br>48,17     | 0,80   |
|             | ESR 2  | 44,14       | 40,38<br>46,64     | 43,85       | 40,56<br>46,05     | 0,61   |
|             | ERBB 2 | 36,83       | 32,49<br>40,24     | 38,59       | 34,85<br>41,61     | 0,008  |
|             | KRT 5  | 35,16       | 30,07<br>45,80     | 34,14       | 24,05<br>43,12     | 0,03   |
|             | KRT 20 | 44,67       | 35,06<br>51,39     | 47,16       | 41,08<br>50,14     | 0,008  |

## 8.5 Einfluss der Zeitspanne zwischen TURB und CX auf die Differenz der Genexpression

Tabelle 22: Differenz der Genexpression TURB - CX

| Gen           | Minimum<br>Maximum | Median | Mittelwert | Standardabweichung |
|---------------|--------------------|--------|------------|--------------------|
| <b>ESR 1</b>  | -3,91<br>3,45      | 0,31   | -0,24      | 1,80               |
| <b>ESR 2</b>  | -3,16<br>6,76      | 0,25   | 0,32       | 2,20               |
| <b>ERBB 2</b> | -1,68<br>5,66      | 0,99   | 0,96       | 1,47               |
| <b>KRT 5</b>  | -6,28<br>6,13      | 0,82   | 0,65       | 2,88               |
| <b>KRT 20</b> | -1,94<br>10,08     | 1,32   | 2,13       | 3,03               |

Tabelle 23: Einfluss der Zeitspanne zwischen TURB und CX auf die Differenz der Genexpression

| Gen           | Teilungspunkt der Kohorte  |                   |                           |
|---------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|
|               | Unteres Quartil<br>26 Tage | Median<br>40 Tage | Oberes Quartil<br>60 Tage |
|               | p-Wert                     | p-Wert            | p-Wert                    |
| <b>ESR 1</b>  | 0,31                       | 0,63              | 0,27                      |
| <b>ESR 2</b>  | 0,38                       | 0,59              | 0,91                      |
| <b>ERBB 2</b> | 0,21                       | 0,16              | 0,32                      |
| <b>KRT 5</b>  | 0,32                       | 0,39              | 0,81                      |
| <b>KRT 20</b> | 0,20                       | 0,84              | 0,97                      |

## 8.6 Korrelation der Genexpression zwischen den Gewebeproben

Tabelle 24: Korrelation der Genexpression zwischen den Gewebeproben

| Gen           | Variable    | mit Variable | Spearman $\rho$ | Wahrscheinlichkeit<br>>  $\rho$ |
|---------------|-------------|--------------|-----------------|---------------------------------|
| <b>ESR 1</b>  | TURB        | Zystektomie  | 0,3095          | 0,0961                          |
|               | TURB        | Lymphknoten  | 0,5733          | 0,0009                          |
|               | Zystektomie | Lymphknoten  | 0,3918          | 0,0085                          |
| <b>ESR 2</b>  | TURB        | Zystektomie  | -0,4202         | 0,0208                          |
|               | TURB        | Lymphknoten  | -0,2291         | 0,2320                          |
|               | Zystektomie | Lymphknoten  | 0,2101          | 0,1873                          |
| <b>ERBB 2</b> | TURB        | Zystektomie  | 0,6222          | 0,0003                          |
|               | TURB        | Lymphknoten  | 0,5394          | 0,0025                          |
|               | Zystektomie | Lymphknoten  | 0,7574          | <0,0001                         |
| <b>KRT 5</b>  | TURB        | Zystektomie  | 0,8167          | <0,0001                         |
|               | TURB        | Lymphknoten  | 0,8369          | <0,0001                         |
|               | Zystektomie | Lymphknoten  | 0,6610          | <0,0001                         |
| <b>KRT 20</b> | TURB        | Zystektomie  | 0,6465          | 0,0004                          |
|               | TURB        | Lymphknoten  | 0,4308          | 0,0316                          |
|               | Zystektomie | Lymphknoten  | 0,5858          | 0,0002                          |

## 8.7 Überlebensanalysen

## 8.7.1 Gesamtüberleben nach Genexpressionshöhe

Tabelle 25: Gesamtüberleben nach Genexpression, Einteilung durch Median

| Gen    | Gewebe | Einteilung durch Median |        |      |                  |                 |
|--------|--------|-------------------------|--------|------|------------------|-----------------|
|        |        | Trennung bei            | p-Wert | HR   | Untere 95%<br>KI | Obere 95%<br>KI |
| ESR 1  | TURB   | 45,52                   | 0,82   | 0,90 | 0,36             | 2,22            |
|        | CX     | 46,00                   | 0,59   | 0,82 | 0,41             | 1,67            |
|        | LK     | 46,28                   | 0,83   | 1,07 | 0,52             | 2,21            |
| ESR 2  | TURB   | 43,15                   | 0,06   | 2,37 | 0,94             | 6,43            |
|        | CX     | 43,47                   | 0,63   | 0,84 | 0,41             | 1,70            |
|        | LK     | 43,86                   | 0,39   | 1,35 | 0,66             | 2,75            |
| ERBB 2 | TURB   | 38,69                   | 0,0318 | 0,35 | 0,12             | 0,91            |
|        | CX     | 37,74                   | 0,68   | 0,86 | 0,42             | 1,77            |
|        | LK     | 38,03                   | 0,36   | 1,37 | 0,68             | 2,79            |
| KRT 5  | TURB   | 37,05                   | 0,37   | 0,67 | 0,26             | 1,62            |
|        | CX     | 36,50                   | 0,59   | 1,20 | 0,59             | 2,44            |
|        | LK     | 34,78                   | 0,61   | 0,82 | 0,39             | 1,72            |
| KRT 20 | TURB   | 46,69                   | 0,26   | 0,59 | 0,21             | 1,48            |
|        | CX     | 44,82                   | 0,47   | 1,29 | 0,62             | 2,65            |
|        | LK     | 45,74                   | 0,59   | 1,20 | 0,59             | 2,45            |

Tabelle 26: Gesamtüberleben nach Genexpression, Einteilung durch Partitionstest nach Gesamtüberleben

| Gen           | Gewebe | Einteilung durch Partitionstest nach Gesamtüberleben |        |      |                  |                 |
|---------------|--------|--|--------|------|------------------|-----------------|
|               |        | Trennung bei   | p-Wert | HR   | Untere 95%<br>KI | Obere 95%<br>KI |
| <b>ESR 1</b>  | TURB   | 46,78  | 0,85   | 0,91 | 0,31             | 2,33            |
|               | CX     | 45,30  | 0,0114 | 0,35 | 0,16             | 0,78            |
|               | LK     | 47,31  | 0,13   | 0,49 | 0,16             | 1,22            |
| <b>ESR 2</b>  | TURB   | 43,81  | 0,0019 | 5,38 | 1,90             | 15,23           |
|               | CX     | 42,15  | 0,07   | 0,45 | 0,20             | 1,07            |
|               | LK     | 44,86  | 0,79   | 0,88 | 0,31             | 2,09            |
| <b>ERBB 2</b> | TURB   | 38,71  | 0,0318 | 0,35 | 0,12             | 0,91            |
|               | CX     | 38,84  | 0,0139 | 2,74 | 1,24             | 5,79            |
|               | LK     | 40,01  | 0,0065 | 4,56 | 1,59             | 11,63           |
| <b>KRT 5</b>  | TURB   | 41,38  | 0,43   | 1,55 | 0,48             | 4,29            |
|               | CX     | 38,33  | 0,10   | 1,86 | 0,86             | 3,90            |
|               | LK     | 34,52  | 0,27   | 0,66 | 0,31             | 1,39            |
| <b>KRT 20</b> | TURB   | 48,36  | 0,0311 | 0,29 | 0,06             | 0,90            |
|               | CX     | 42,25  | 0,20   | 0,58 | 0,26             | 1,36            |
|               | LK     | 49,39  | 0,06   | 2,82 | 0,92             | 7,21            |

## 8.7.2 Progressionsfreies Überleben nach Genexpressionshöhe

Tabelle 27: Progressionsfreies Überleben nach Genexpression, Einteilung durch Median

| Gen    | Gewebe | Einteilung durch Median |        |      |                  |                 |
|--------|--------|-------------------------|--------|------|------------------|-----------------|
|        |        | Trennung bei            | p-Wert | HR   | Untere 95%<br>KI | Obere 95%<br>KI |
| ESR 1  | TURB   | 45,52                   | 0,55   | 0,72 | 0,22             | 2,09            |
|        | CX     | 46,00                   | 0,71   | 1,17 | 0,50             | 2,77            |
|        | LK     | 46,28                   | 0,84   | 1,09 | 0,45             | 2,53            |
| ESR 2  | TURB   | 43,15                   | 0,55   | 1,37 | 0,46             | 4,05            |
|        | CX     | 43,47                   | 0,97   | 0,98 | 0,42             | 2,35            |
|        | LK     | 43,86                   | 0,0501 | 2,33 | 0,99             | 5,57            |
| ERBB 2 | TURB   | 38,69                   | 0,0208 | 0,27 | 0,08             | 0,82            |
|        | CX     | 37,73                   | 0,11   | 0,50 | 0,20             | 1,18            |
|        | LK     | 38,03                   | 0,23   | 0,59 | 0,23             | 1,39            |
| KRT 5  | TURB   | 37,05                   | 0,53   | 1,39 | 0,48             | 4,25            |
|        | CX     | 36,50                   | 0,54   | 1,29 | 0,55             | 3,07            |
|        | LK     | 34,78                   | 0,63   | 1,22 | 0,52             | 2,90            |
| KRT 20 | TURB   | 46,69                   | 0,92   | 1,05 | 0,36             | 3,21            |
|        | CX     | 44,82                   | 0,92   | 1,04 | 0,43             | 2,41            |
|        | LK     | 45,74                   | 0,99   | 0,99 | 0,41             | 2,33            |

Tabelle 28: Progressionsfreies Überleben nach Genexpression, Einteilung durch Partitionstest nach progressionsfreiem Überleben

| Gen    | Gewebe | Einteilung durch Partitionstest nach progressionsfreiem Überleben |        |      |               |              |
|--------|--------|---|--------|------|---------------|--------------|
|        |        | Trennung bei  | p-Wert | HR   | Untere 95% KI | Obere 95% KI |
| ESR 1  | TURB   | 46,78   | 0,32   | 0,49 | 0,07          | 1,85         |
|        | CX     | 45,33   | 0,13   | 0,50 | 0,21          | 1,24         |
|        | LK     | 47,31   | 0,11   | 0,35 | 0,05          | 1,23         |
| ESR 2  | TURB   | 43,81   | 0,06   | 3,66 | 0,89          | 13,18        |
|        | CX     | 42,15   | 0,10   | 0,42 | 0,16          | 1,22         |
|        | LK     | 44,05   | 0,011  | 3,06 | 1,29          | 7,38         |
| ERBB 2 | TURB   | 38,72   | 0,0208 | 0,27 | 0,08          | 0,82         |
|        | CX     | 37,74   | 0,0473 | 0,41 | 0,16          | 0,98         |
|        | LK     | 39,28   | 0,85   | 1,10 | 0,31          | 3,00         |
| KRT 5  | TURB   | 41,38   | 0,0041 | 6,52 | 1,85          | 25,63        |
|        | CX     | 40,70   | 0,0472 | 2,76 | 1,01          | 6,94         |
|        | LK     | 37,55   | 0,0497 | 2,52 | 1,00          | 5,96         |
| KRT 20 | TURB   | 45,73   | 0,65   | 0,76 | 0,20          | 2,32         |
|        | CX     | 47,88   | 0,49   | 0,66 | 0,15          | 1,96         |
|        | LK     | 41,08   | 0,15   | 0,50 | 0,21          | 1,32         |



## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <p><b>ABBILDUNG 1: VERGLEICH VERSCHIEDENER EINTEILUNGSMODELLE DES UROTHELKRZINOMS</b> VON UNTERSCHIEDLICHEN ARBEITSGRUPPEN UND GEGENÜBERSTELLUNG MIT DER EINTEILUNG FÜR BRUSTKREBS. ADAPTIERT NACH 27 .....</p>  | 7  |
| <p><b>ABBILDUNG 2 A:</b> DIE 10-FACH BESTIMMUNG VON ERBB 2 ZEIGT DIE INTERASSAY- VARIANZ VON ZWEI VERDÜNNUNGSSTUFEN AM DETEKTIONSLIMIT. <b>ABBILDUNG 2 B:</b> DIE GENEXPRESSION AUFSTEIGENDER VERDÜNNUNGSSTUFEN VERANSCHAULICHT DIE EFFIZIENZ DER PCR, WELCHE FÜR DIE NORMALISIERUNG WICHTIG IST. ....</p>   | 19 |
| <p><b>ABBILDUNG 3 A UND B: GEGENÜBERSTELLUNG DER GENEXPRESSION IN DEN VERSCHIEDENEN GEWEBEPROBEN.</b> ESR 1 UND KERATIN 5 MIT CALM BZW. RPL ALS REFERENZGEN. ....</p>  | 21 |
| <p><b>ABBILDUNG 4 A BIS E: GENEXPRESSION DER ZIELGENE NACH GEWEBE.</b> <b>ABBILDUNG 4A UND B:</b> FÜR ESR 1 UND ESR 2 ZEIGTEN SICH KEINE UNTERSCHIEDE IN DER GENEXPRESSION. <b>ABBILDUNG 4C:</b> FÜR ERBB 2 KONNTE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED IN DER GENEXPRESSION ZWISCHEN TURB UND CX- GEWEBE FESTGESTELLT WERDEN. <b>ABBILDUNG 4D:</b> DIE GENEXPRESSION VON KRT 5 WICH ZWISCHEN TURB UND LK- GEWEBE SIGNIFIKANT AB. <b>ABBILDUNG 4E:</b> EINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN DER GENEXPRESSION VON KRT 20 ZEIGTE SICH SOWOHL IM GEWEBE VON TURB UND CX ALS AUCH IM GEWEBE VON TURB UND LK. ....</p>              | 22 |
| <p><b>ABBILDUNG 5 A UND B: GENEXPRESSION DER ÖSTROGENREZEPTOREN, GETRENNT NACH GESCHLECHT UND GEWEBE.</b> WEDER FÜR ESR 1 NOCH FÜR ESR 2 ERGAB SICH EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN GRUPPEN. ....</p>   | 24 |
| <p><b>ABBILDUNG 6 A BIS C: KORRELATION DER GENEXPRESSION ZWISCHEN DEN GEWEBEPROBEN.</b> <b>ABBILDUNG 6A</b> ZEIGT DIE SIGNIFIKANTE KORRELATION VON ERBB 2 ZWISCHEN TURB UND CX (<math>p=0,6222</math>, <math>p=0,0003</math>). <b>ABBILDUNG 6B:</b> FÜR KRT 5 ERGAB SICH ZWISCHEN TURB UND CX EINE SIGNIFIKANTE KORRELATION (<math>p= 0,8167</math>, <math>p=&lt;0,0001</math>). <b>ABBILDUNG 6C:</b> ÜBERSICHT ÜBER DIE ERMITTELTEN SPEARMAN- KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN DER UNTERSCHIEDLICHEN GENE ZWISCHEN DEN JEWELIGEN GEWEBEPROBEN. ....</p>  | 25 |
| <p><b>ABBILDUNG 7 A BIS D: GESAMTÜBERLEBEN NACH GENEXPRESSION IM GEWEBE DER ZYSTEKTOMIE.</b> <b>ABBILDUNG 7 A UND B:</b> DIE KOHORTE WURDE AM MEDIAN DER ESR 1- BZW. ERBB 2- GENEXPRESSION IN DER ZYSTEKTOMIE GETRENNT. DAS GESAMTÜBERLEBEN ZEIGTE KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (ESR 1: <math>p=0,59</math>; ERBB 2: <math>p=0,68</math>). <b>ABBILDUNG 7 C UND D:</b> GETRENNT MIT HILFE DES PARTITIONSTESTS ERMITTELTEN GRENZWERT ERGABEN SICH SIGNIFIKANTE ÜBERLEBENSUNTERSCHIEDE FÜR IN DER ZYSTEKTOMIE ERMITTELTEN GENEXPRESSIONSWERTE VON ESR 1 (<math>p=0,005</math>) UND ERBB2 (<math>p=0,01</math>).....</p>    | 27 |
| <p><b>ABBILDUNG 8: PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN NACH GENEXPRESSION IM GEWEBE DER ZYSTEKTOMIE.</b> <b>ABBILDUNG 8 A UND B:</b> DIE KOHORTE WURDE AM MEDIAN DER KRT 5- BZW. ERBB 2- GENEXPRESSION IN DER ZYSTEKTOMIE GETRENNT. DAS GESAMTÜBERLEBEN ZEIGTE KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (KRT 5: <math>p=0,54</math>; ERBB 2: <math>p=0,1</math>). <b>ABBILDUNG 8 C UND D:</b> GETRENNT MIT HILFE DES PARTITIONSTESTS ERMITTELTEN GRENZWERT ERGABEN SICH SIGNIFIKANTE ÜBERLEBENSUNTERSCHIEDE FÜR IN DER ZYSTEKTOMIE ERMITTELTEN GENEXPRESSIONSWERTE VON KRT 5 (<math>p=0,04</math>) UND ERBB2 (<math>p=0,04</math>).....</p> | 28 |
| <p><b>ABBILDUNG 9 A UND B: PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN DER PATIENTEN MIT LUMINALEN UND BASALEN TUMOREN.</b> <b>ABBILDUNG 9 A:</b> PATIENTENKOHORTE AM MEDIAN DER GENEXPRESSION GETRENNT UND IN LUMINALE UND BASALE TUMOREN EINGETEILT. DAS PROGRESSIONSFREIE ÜBERLEBEN WAR NICHT SIGNIFIKANT UNTERSCHIEDLICH (<math>p= 0,65</math>). <b>ABBILDUNG 9 B:</b> DIE GRUPPEN</p>  |    |

|  |    |
|--|----|
| WURDEN NACH TRENNUNG MIT HILFE DES PARTITIONSTESTS EINGETEILT. EIN STATISTISCH SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED DES PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBENS WAR ERKENNBAR (p=0,0178). ..... | 30 |
| ABBILDUNG 10: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT CALM ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 1 BERECHNET .....  | 47 |
| ABBILDUNG 11: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT CALM ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 2 BERECHNET .....  | 48 |
| ABBILDUNG 12: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT RPL ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 1 BERECHNET .....   | 49 |
| ABBILDUNG 13: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT RPL ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 2 BERECHNET .....   | 50 |
|  |    |
| TABELLE 1: VERWENDETE PRIMER .....   | 13 |
| TABELLE 2: VERWENDETE SONDEN .....   | 14 |
| TABELLE 3: TUMORKLASSIFIKATION DER EINGESCHLOSSENEN PATIENTEN .....  | 17 |
| TABELLE 4: DETEKTIONSLIMITS DER GENEXPRESSIONSBESTIMMUNG .....   | 19 |
| TABELLE 5: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE OHNE NORMALISIERUNG .....  | 20 |
| TABELLE 6: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT CALM ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 1 BERECHNET .....   | 47 |
| TABELLE 7: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT CALM ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 2 BERECHNET .....   | 48 |
| TABELLE 8: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT RPL ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 1 BERECHNET .....  | 49 |
| TABELLE 9: GENEXPRESSION ALLER GEWEBE MIT RPL ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 2 BERECHNET .....  | 50 |
| TABELLE 10: GENEXPRESSION ALLER GENE IN ALLEN GEWEBEN MIT CALM ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 1 BERECHNET .....   | 51 |
| TABELLE 11: GENEXPRESSION ALLER GENE IN ALLEN GEWEBEN MIT RPL ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 1 BERECHNET .....  | 52 |
| TABELLE 12: GENEXPRESSION ALLER GENE IN ALLEN GEWEBEN MIT CALM ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 2 BERECHNET .....   | 53 |
| TABELLE 13: GENEXPRESSION ALLER GENE IN ALLEN GEWEBEN MIT RPL ALS REFERENZGEN, MIT FORMEL 2 BERECHNET .....  | 54 |
| TABELLE 14: ESR 1 NACH GEWEBEPROBE .....   | 55 |
| TABELLE 15: ESR 2 NACH GEWEBEPROBE .....   | 55 |
| TABELLE 16: ERBB 2 NACH GEWEBEPROBE .....  | 55 |
| TABELLE 17: KERATIN 5 NACH GEWEBEPROBE .....   | 56 |
| TABELLE 18: KERATIN 20 NACH GEWEBEPROBE .....  | 56 |
| TABELLE 19: GENEXPRESSIONSWERTE NACH GESCHLECHT .....  | 57 |
| TABELLE 20: VERGLEICH DER GENEXPRESSION STADIUM T2/T3 GEGEN T4 .....   | 58 |
| TABELLE 21: GENEXPRESSION, JE NACH TUMORANTEIL DES UNTERSUCHTEN GEWEBES .....  | 59 |
| TABELLE 22: DIFFERENZ DER GENEXPRESSION TURB - CX .....  | 60 |
| TABELLE 23: EINFLUSS DER ZEITSPANNE ZWISCHEN TURB UND CX AUF DIE DIFFERENZ DER GENEXPRESSION .....   | 60 |
| TABELLE 24: KORRELATION DER GENEXPRESSION ZWISCHEN DEN GEWEBEPROBEN .....  | 61 |
| TABELLE 25: GESAMTÜBERLEBEN NACH GENEXPRESSION, EINTEILUNG DURCH MEDIAN .....  | 62 |
| TABELLE 26: GESAMTÜBERLEBEN NACH GENEXPRESSION, EINTEILUNG DURCH PARTITIONSTEST NACH GESAMTÜBERLEBEN .....   | 63 |
| TABELLE 27: PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN NACH GENEXPRESSION, EINTEILUNG DURCH MEDIAN .....   | 64 |
| TABELLE 28: PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN NACH GENEXPRESSION, EINTEILUNG DURCH PARTITIONSTEST NACH PROGRESSIONSFREIEM ÜBERLEBEN .....                                       | 65 |

## 10 Lebenslauf

Name: Christopher Michael Böhmer

Geburtsdatum: 28.01.1987

Geburtsort: Mainz

### SCHULISCHER WERDEGANG

2006: Abitur am Gymnasium Theresianum Mainz

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

Wintersemester 2012/2013 bis Sommersemester 2017:

Studium der Humanmedizin an der Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Wintersemester 2017 bis Wintersemester 2018:

Praktisches Jahr am Klinikum Worms, Akademisches Lehrkrankenhaus der Johannes- Gutenberg- Universität Mainz

### BERUFSWEG

2006 bis 2017: Zivildienst als Rettungssanitäter, anschließend Ausbildung zum Rettungsassistenten und Anstellung bei DRK- Rettungsdienst Rheinhessen- Nahe gGmbH

Seit 2019: Assistenzarzt in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Worms gGmbH

## 11 Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit waren mehr Menschen beteiligt als es auf dem Titelblatt scheint.

Dem Team des urologischen Forschungslabors, allen voran Frau Annette Steidler, gilt ein besonderer Dank. Ohne die unendliche Geduld mir die Abläufe, die Arbeitsprotokolle und das „Ticken“ eines wissenschaftlichen Labors nahezubringen, wäre ich vermutlich schon nach den Kennenlerntagen nicht mehr wiedergekommen.

Herrn Philipp Erben danke ich für die Idee und den wissenschaftlichen Hintergrund der Fragestellung. Ebenso für das immer offene Ohr für Fragen und Nöte und natürlich das Feedback beim Schreiben der Arbeit.

Herrn Maximilian Kriegmair danke ich für die Unterstützung bei der Patientenauswahl, der Recherche der klinischen Daten und des Follow-up. Außerdem Danke für die Hilfe beim Erstellen und Interpretieren der Statistik, sowie für die Hinweise und Verbesserungsvorschläge beim Schreiben der Arbeit.

Weder das Medizinstudium noch diese Arbeit wären ohne meine Familie denkbar.

Anna, vielen Dank für all deine Liebe und Zuversicht, die Motivation und das Verständnis. Mit dir als Gefährtin geht alles leichter.

Danke Ida für dein Lächeln und deinen Spaß daran, meinen Schreibtisch „aufzuräumen“, während ich versuche an meiner Arbeit zu schreiben.

Mrs. XX bzw. Mr. XY (aktuell in Zustellung) bitte ich schon jetzt um Verzeihung, dass sie/er sich vermutlich nicht nur einmal den Inhalt meiner Promotion anhören muss.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie immer hinter meinen Entscheidungen und Wünschen stehen und mir ermöglicht haben zu dem Menschen zu werden, der ich nun bin.

In Gedanken ist diese Promotion immer auch mit meiner Oma verknüpft, die in der Zeit meiner Forschungsarbeit verstorben ist. Danke für die vielen Erinnerungen.