

Aus dem Lehrstuhl
Für Urologie
Direktor Prof. Dr. Maximilian Burger
Der Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

**Zusammenhang zwischen der Aquaporinexpression auf mRNA Ebene und
Grading, Staging sowie deren Einfluss auf die Prognose von Patienten mit
nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom (NMIBC)**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sebastian Kälble

2021

Aus dem Lehrstuhl
Für Urologie
Direktor Prof. Dr. Maximilian Burger
Der Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

**Zusammenhang zwischen der Aquaporinexpression auf mRNA Ebene und
Grading, Staging sowie deren Einfluss auf die Prognose von Patienten mit
nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom (NMIBC)**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sebastian Kälble

2021

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1.Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Breyer
2.Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Stephan Seitz
Tag der mündlichen Prüfung:	16.03.2021

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	8
1.1	DAS HARNBLASENKARZINOM	8
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE	8
1.1.2	KLASSIFIKATION	9
1.1.3	REZIDIV – UND PROGRESSIONSRISIKOKLASSIFIZIERUNG DES NMIBC	10
1.1.4	RISIKOFAKTOREN	13
1.1.5	KLINIK	14
1.1.6	DIAGNOSTIK	15
1.2	DAS NICHT-MUSKELINVASIVE BLASENKARZINOM (NMIBC)	15
1.2.1	THERAPIE DES NMIBC	15
1.2.2	NACHRESEKTION BEI NMIBC	16
1.2.3	INTRAVESIKALE INSTILLATIONSTHERAPIE	16
1.2.4	FRÜHZYSTEKTOMIE	17
1.2.5	NACHSORGE DES NMIBC	19
1.3	DAS MUSKELINVASIVE BLASENKARZINOM (MIBC)	19
1.3.1	THERAPIE	19
1.4	NOTWENDIGKEIT PROGNOSTISCHER BIOMARKER	20
1.5	AQUAPORINE	21
1.5.1	VORKOMMEN UND BIOLOGISCHE FUNKTION	21
1.5.2	AUSWIRKUNG EINES FUNKTIONSVERLUSTES VON AQP 1, 2 UND 3	23
1.5.3	ROLLE VON AQUAPORINEN IN TUMOREN	24
1.5.4	ROLLE DER AQUAPORINE BEIM UROTHELKRZINOM	25
1.6	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	26
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	27
2.1	AUFBAU DER MESSUNG	27
2.2	DURCHFÜHRUNG	29
2.2.1	GEWEBEGEWINNUNG AUS PARAFFINBLÖCKEN	29
2.2.2	RNA ISOLIERUNG MIT MIRNA FFPE KIT QUIAGEN	29
2.2.3	RNA UV-MESSUNG MIT THERMO SCIENTIFIC NANO DROP 2000C	31
2.2.4	PCR MIT BIO RAD iTAQ UNIVERSAL PROBES ONE STEP KIT	31
2.2.4.1	Vorbereitung der PCR	31

2.2.4.2	Durchführung der PCR	35
2.2.5	BERECHNUNG DER NORMIERTEN CQ WERTE	36
2.3	BEISPIELGRAPHIKEN DER MRNA MESSUNGEN	36
2.3.1	MESSUNG DER HOUSEKEEPINGGENE	37
2.3.1.1	TBP1	37
2.3.1.2	CALM2	38
2.3.2	MESSUNG DER AQUAPORINE	39
2.3.2.1	Messung AQP3	39
2.3.2.2	Messung AQP4	40
2.3.2.3	Messung AQP7	41
2.3.2.4	Messung AQP9	42
2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	43
3	ERGEBNISSE	43
<hr/>		
3.1	GESAMTKOHORTE	43
3.1.1	PATIENTENKOLLEKTIV	43
3.1.2	AQP-EXPRESSION IN DER T1 NMIBC KOHORTE	45
3.1.3	KORRELATION DER AQUAPORIN-MRNA-EXPRESSION MIT KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN PARAMETERN	49
3.1.4	KORRELATION DER AQUAPORINE UNTEREINANDER	50
3.1.5	KAPLAN - MEIER - ÜBERLEBENSZEITANALYSE	51
3.1.5.1	Überlebenszeitanalyse unterschiedlicher Aquaporinexpressionen	51
3.1.5.1.1	Korrelation der AQP3-mRNA-Expression mit dem Überleben	52
3.1.5.1.1.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	52
3.1.5.1.1.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	52
3.1.5.1.1.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	53
3.1.5.1.2	Korrelation der AQP4-mRNA-Expression mit dem Überleben	53
3.1.5.1.2.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	53
3.1.5.1.2.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	53
3.1.5.1.2.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	53
3.1.5.1.3	Korrelation der AQP7-mRNA-Expression mit dem Überleben	54
3.1.5.1.3.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	54
3.1.5.1.3.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	54
3.1.5.1.3.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	54
3.1.5.1.4	Korrelation der AQP9-mRNA-Expression mit dem Überleben	55

3.1.5.1.4.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	55
3.1.5.1.4.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	55
3.1.5.1.4.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	56
3.1.5.2	Überlebenszeitanalyse klinischer und pathologischer Parameter	56
3.1.5.2.1	Einfluss der Fokalität auf das Überleben	56
3.1.5.2.1.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	57
3.1.5.2.1.2	Progressionsfreies Überleben(PFS)	57
3.1.5.2.1.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	58
3.1.5.2.2	Einfluss des Blasenerhalts und des Zeitpunkts der Zystektomie auf das Überleben	59
3.1.5.2.2.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	59
3.1.5.2.2.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	59
3.1.5.2.2.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	60
3.1.5.2.3	Einfluss des Gradings nach WHO2004/2016 auf das Überleben	61
3.1.5.2.3.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	61
3.1.5.2.3.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	61
3.1.5.2.3.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	62
3.1.6	UNTERTEILUNG DER GESAMTKOHORTE ANHAND KLINISCHER UND PATHOLOGISCHER PARAMETER	62
3.1.6.1	Patienten mit einem G3 Tumor nach WHO1973	62
3.1.6.1.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	63
3.1.6.1.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	63
3.1.6.1.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	64
3.1.6.2	Patienten mit multifokalem Tumor	64
3.1.6.3	Patienten mit konkomittantem Cis	65
3.1.6.4	Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm	65
3.2	KOHORTE OHNE FRÜHZYSTEKTOMIEN	65
3.2.1	PATIENTENKOLLEKTIV	65
3.2.2	AQP-EXPRESSION IN DER T1 NMIBC KOHORTE OHNE FRÜHZYSTEKTOMIE	67
3.2.3	KORRELATION DER AQUAPORIN-MRNA-EXPRESSION MIT KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN PARAMETERN	70
3.2.4	KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE DER KOHORTE OHNE FRÜHZYSTEKTOMIE	71
3.2.4.1	Überlebenszeitanalyse unterschiedlicher Aquaporinexpressionen	72
3.2.4.1.1	Korrelation der AQP3-mRNA-Expression mit dem Überleben	72
3.2.4.1.1.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	72
3.2.4.1.1.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	73
3.2.4.1.1.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	73

3.2.4.1.2	Korrelation der AQP4-mRNA-Expression mit dem Überleben	73
3.2.4.1.2.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	73
3.2.4.1.2.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	73
3.2.4.1.2.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	74
3.2.4.1.3	Korrelation der AQP7-mRNA-Expression mit dem Überleben	74
3.2.4.1.3.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	74
3.2.4.1.3.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	74
3.2.4.1.3.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	74
3.2.4.1.4	Korrelation der AQP9-mRNA-Expression mit dem Überleben	75
3.2.4.1.4.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	75
3.2.4.1.4.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	75
3.2.4.1.4.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	75
3.2.4.2	Überlebenszeitanalyse klinischer und pathologischer Parameter	76
3.2.4.2.1	Einfluss des Gradings nach WHO2004/2016 auf das Überleben	76
3.2.4.2.1.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	76
3.2.4.2.1.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	77
3.2.4.2.1.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	77
3.2.4.2.2	Einfluss der Fokalität auf das Überleben	77
3.2.4.2.2.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	77
3.2.4.2.2.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	78
3.2.4.2.2.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	79
3.2.5	UNTERTEILUNG DER KOHORTE OHNE FRÜHZYSTEKTOMIEN ANHAND KLINISCHER UND PATHOLOGISCHER PARAMETER	79
3.2.5.1	Patienten mit BCG Instillationstherapie	80
3.2.5.1.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	80
3.2.5.1.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	80
3.2.5.1.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	81
3.2.5.2	Patienten mit einem G3 Tumor nach WHO1973	81
3.2.5.2.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	82
3.2.5.2.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	82
3.2.5.2.2.1	AQP7	82
3.2.5.2.2.2	AQP9	82
3.2.5.2.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	83
3.2.5.3	Patienten mit multifokalen Tumoren	83
3.2.5.4	Patienten mit konkomittantem Cis	83

3.2.5.5	Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm	84
3.2.5.5.1	Rezidivfreies Überleben (RFS)	84
3.2.5.5.2	Progressionsfreies Überleben (PFS)	84
3.2.5.5.3	Karzinomspezifisches Überleben (CSS)	84
3.2.5.5.3.1	AQP3	84
4	DISKUSSION	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	ANHANG	100
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100
6.2	TABELLENVERZEICHNIS	101
6.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
7	LITERATURVERZEICHNIS	105
8	PUBLIKATIONEN	120
8.1	KONGRESSBEITRÄGE	120
8.2	PAPER	120
9	DANKSAGUNG	121
10	ERKLÄRUNG	121
11	LEBENS LAUF	122

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist gemäß den Informationen der International Agency for Research on Cancer (IARC) weltweit der 10. häufigste Tumor und die 14. häufigste Ursache für Krebsstod. Dabei erkranken Männer im weltweiten Durchschnitt ca. 4-mal häufiger als Frauen (Standardisierte Erkrankungsrate pro 100.000: 9,0:2,2 – Stand 2012) (1). Es ist der 4. häufigste Tumor beim Mann und der 14. häufigste der Frau (2) und ist damit der zweithäufigste Tumor im Fachbereich Urologie (3).

In den USA verursacht das Harnblasenkarzinom jährlich Kosten in Höhe von 3,4 Milliarden US-Dollar und gehört damit zu den teuersten Tumorentitäten (4). Ca. 75% der Patienten haben bei Diagnosestellung ein nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom (NMIBC) (Ta, Cis, T1), 25% der Blasentumore sind muskelinvasiv (T2, T3, T4) (5).

2012 erkrankten in Deutschland ca. 28.000 Menschen an einem Harnblasenkarzinom, wovon etwa 15.400 invasiv waren. Ca. 13.500 konnten nicht-invasiven, papillären Karzinomen und Carcinomata in situ (Cis) zugeordnet werden.

Da das mittlere Erkrankungsalter zwischen 73 und 77 Jahren (Frauen und Männer) liegt, wird diese Zahl im Zuge des demographischen Wandels weiter steigen (6).

Männer haben auch in Deutschland ein vierfach höheres Erkrankungsrisiko als Frauen. Knapp 75% der erkrankten Patienten sind Männer. Das Erkrankungsrisiko steigt dabei mit höherem Alter stetig an (6).

Sowohl die Erkrankungsraten, als auch die Sterberaten sind für Männer seit 1999 rückläufig, was mit der Reduktion des Tabakkonsums zu tun haben könnte. Für Frauen sind sie nahezu gleichgeblieben (7). Zwar erkranken Männer häufiger am Harnblasenkarzinom, jedoch liegt die relative Überlebensrate bei Frauen niedriger als bei Männern (Stand 2011-12). Als ein Grund wird die oft spätere Diagnosestellung eines Harnblasenkarzinoms bei Frauen diskutiert. Blasenkarzinome werden bei Frauen häufiger in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert.

So haben Männer bei Erstdiagnose in 47% ein T1 - und in 34 % ein T2 Karzinom. Gegenüber 37% T1 - und 39% T2 Karzinomen bei Frauen (8). Als Gründe hierfür werden zum einen die bei Frauen dünnere Blasenwand (insbesondere Muskulatur), sowie eine verspätete Diagnosestellung durch Verkennen des Leitsymptoms – schmerzlose Makrohämaturie – als Infekt bedingt oder Menstruationsblutung.

1.1.2 Klassifikation

Harnblasenkarzinome sind zu 95% Urothelkarzinome. Man unterscheidet dabei papilläre von soliden Tumoren. Die restlichen 5% machen Plattenepithel- und Adenokarzinome aus (9).

Das Grading der Urothelkarzinome erfolgt mithilfe des WHO/ISUP Systems von 2004 (aktualisiert 2016) und dem WHO System von 1973.

Das WHO/ISUP System von 2004 unterscheidet papilläre urotheliale Neoplasien mit niedrigem malignem Potenzial (PUNLMP), papilläre nicht invasive Urothelkarzinome vom low- und high-grade-Typ und Papillome.

Das WHO System von 1973 beinhaltet G1 Tumoren, die teilweise dem PUNLMP zugerechnet werden. G1 und ein Teil der besser differenzierten G2 Tumoren werden in der low-grade Gruppe zusammengefasst. Die high-grade Gruppe schließt schlecht differenzierte G2 und G3 Tumoren ein (10). Beide Grading-Systeme sollten verwendet und bei der histopathologischen Diagnosestellung angegeben werden. Das Staging, also die Tumorstadieneinteilung, erfolgt mit der von der WHO 2016 aktualisierten TNM Klassifikation (Tabelle 1).

Tabelle 1: TNM – Klassifikation – Urothelkarzinom der Harnblase; adaptiert nach S3-Leitlinie - September 2016 (11).

Klassifikation	Tumor
T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Nachweis von Primärtumor
Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ: „Flache Neoplasie“
T1	Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein
T2	Tumor dringt in Muskularis propria ein
T2a	Tumor dringt in oberflächliche Muskularis propria ein (innere Hälfte)

T2b	Tumor dringt tief in Muskularis propria ein (äußere Hälfte)
T3	Tumor dringt in perivesikales Gewebe ein
T3a	Mikroskopisch
T3b	Makroskopisch (Extravesikale Masse)
T4	Tumor dringt in eines der folgenden ein: Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus, Vagina, Beckenwand
T4a	Tumor dringt ein in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor dringt ein in Beckenwand oder Abdominalwand
N	Regionale Lymphknoten
NX	Regionale Lymphknoten können nicht bewertet werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches (ein hypogastrischer, obturatorischer oder präsakraler Lymphknoten oder ein Lymphknoten aus dem Bereich der Arteria iliaca externa)
N2	Metastase in mehreren Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches (ein hypogastrischer, obturatorischer oder präsakraler Lymphknoten oder ein Lymphknoten aus dem Bereich der Arteria iliaca externa)
N3	Metastasen der Lymphknoten an der Arteria iliaca communis
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.1.3 Rezidiv – und Progressionsrisikoklassifizierung des NMIBC

Mithilfe des von Sylvester et al. erstellten Risikoklassifikationssystems können NMIBC in drei Risikogruppen in Bezug auf das Progressions- und Rezidivrisiko eingeteilt werden: low-, intermediate- und high-risk Tumoren.

Sylvester et al. analysierte 2928 Patienten mit NMIBC, die in 7 Studien zwischen 1979 und 1989 gesammelt und beurteilt wurden. Sie wurden vor allem auf das Vorhandensein folgender Risikofaktoren und die damit einhergehende Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit untersucht: Tumorfokalität, Tumorgöße, primäre Rezidivrate, Staging, Grading und Vorhandensein eines konkomittanten Cis. Je vorhandenem Risikofaktor werden abhängig vom Einfluss auf das Auftreten eines Rezidivs oder einer Progression, Punkte vergeben, die am Ende addiert einen Score ergeben. Dieser kann die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient mit diesem Score ein Rezidiv oder eine Progression entwickelt, einschätzen (12) (Tabellen 2 bis 4).

Tabelle 2: Punktesystem für die Berechnung der Rezidiv -und Progressionswahrscheinlichkeit; adaptiert nach Sylvester et al. Eur Urol. 2006 (13).

Faktor	Rezidiv	Progression
Fokalität		
Unifokal	0	0
2-7	3	3
≥8	6	3
Tumordurchmesser		
<3 cm	0	0
≥3 cm	3	3
Rezidivrate		
Primärtumor	0	0
≤1 Rezidiv/Jahr	2	2
>1 Rezidiv/Jahr	4	2
Stadium		
Ta	0	0
T1	1	4
Konkomittantes Cis		
No	0	0
Yes	1	6
Grading WHO1973		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Gesamtpunktzahl	0-17	0-23

Tabelle 3: Rezidivwahrscheinlichkeit je nach Recurrence Score; adaptiert nach Sylvester et al. Eur Urol. 2006 (14).

Gesamtpunktzahl	Rezidiv- wahrscheinlichkeit im 1. Jahr (95% CI)	Rezidivwahrscheinlichkeit in den ersten 5 Jahren (95% CI)	Rezidiv- wahrscheinlichkeit
0	15 (10; 19) %	31 (24; 37) %	Low
1-4	24 (21; 26) %	46 (42; 49) %	Intermediate
5-9	38 (35; 41) %	62 (58; 65) %	Intermediate
10-17	61 (55; 67) %	78 (73; 84) %	High

Tabelle 4: Progressionswahrscheinlichkeit je nach Progression Score; adaptiert nach Sylvester et al. Eur Urol. 2006 (14).

Gesamtpunktzahl	Progressionswahrscheinlichkeit im ersten Jahr (95% CI)	Progressionswahrscheinlichkeit in den ersten 5 Jahren (95% CI)	Progressionswahrscheinlichkeit
0	0,2 (0; 0,7) %	0,8 (0; 1,7) %	Low
2-6	1 (0,4; 1,6) %	6 (5; 8) %	Intermediate
7-13	5 (4; 7) %	17 (14; 20) %	High
14-23	17 (10; 24) %	45 (35; 55) %	High

In Bezug auf die Rezidivwahrscheinlichkeit spielen laut Score vor allem Multifokalität und die Rezidivrate eine Rolle. Die Progressionswahrscheinlichkeit steht vor allem in Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines konkomittanten Cis, schlechter Differenzierung und dem Staging.

Ausgehend von der Arbeit von Sylvester et al. wurde in der S3-Leitlinie der DGU eine konsensbasierte Einteilung in die drei Risikogruppen anhand klinischer und pathologischer Parameter vorgenommen (Tabelle 5). Dabei gehören primäre, solitäre, gut bis mittelgradig differenzierte, pTa Tumore, kleiner drei Zentimeter, zu den low-risk NMIBC.

Multifokale pTa Tumore, pTa Tumore größer 3 cm oder ein aufgetretenes pTa Rezidiv im ersten Jahr, definieren die intermediate-risk NMIBC.

Alle Tumoren mit Stadium pT1, Grading G3, Cis oder mit einer Kombination der Faktoren der intermediate-risk Gruppe werden den high-risk NMIBC zugeteilt.

Tabelle 5: Zuordnung unterschiedlicher Tumorstadien zu den Risikogruppen low, intermediate und high-risk nach S3-Leitlinie - September 2016 (15).

Risikogruppe	Tumorstadien
Low-risk NMIBC	Solitär pTaG1 <3cm Solitär pTaG2 (low-grade) <3cm PUNLMP (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential)
Intermediate-risk NMIBC	Solitär pTaG1 ≥3cm Multifokal pTaG1 Solitär pTaG2 (low-grade) ≥3cm Multifokal pTaG2 (low-grade) pTaG2 (high-grade) Jedes pTaG2 (wenn kein genaueres Grading bekannt ist)

	Jedes Karzinom aus der low-risk-Gruppe, das innerhalb von 12 Monaten rezidiert
High-risk NMIBC	Alle Karzinome mit folgenden Kriterien: Alle T1 Tumore Alle G3 (high-grade) Tumore Alle Cis Multiple rezidivierende und große Tumore (≥ 3 cm) Ta G1/G2 (wenn die genannten Voraussetzungen gleichzeitig vorliegen) Aggressive histologische Varianten des Urothelkarzinoms mit lymphoepithelialer, plasmazytoider, plattenepithelialer, mikropapillärer und / oder kleinzelliger Komponente sowie „nested“ Variante

1.1.4 Risikofaktoren

Ein signifikanter Risikofaktor für das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms ist das Alter. So steigt das Risiko, in den nächsten 10 Jahren zu erkranken, bei Männern von <0,1% mit 35 Jahren auf 1,3% mit 75 Jahren und bei Frauen von <0,1% auf 0,4% (16).

Bis dato gibt es nur wenige Daten zur Rolle genetischer Prädispositionen beim Harnblasenkarzinom (17). Skeldon et al. beobachteten ein erhöhtes Harnblasenkarzinomrisiko bei MSH2 (DNA mismatch Reparaturprotein) Mutation im Rahmen des Lynch Syndroms (18), welches vor allem mit kolorektalen Karzinomen assoziiert wird.

Seit dem Vortrag von Dr. Ludwig Rehn am 20. April 1895 in Berlin (19) gilt das Blasenkarzinom als Modelltumor zum Verständnis der chemisch industriellen Karzinogene.

So sind aromatische Amine, Cyclophosphamid, Chlornaphazin, Phenazetin, Aristolochiasäure (20), 2-Naphthylamin und Benzidin (21) gesicherte Blasenkarzinogene.

Dementsprechend ist das Blasenkarzinom bei Berufsgruppen, die diesen Substanzen ausgesetzt sind, wie Maler und Lackierer, Bergleute, Busfahrer, Arbeiter in der Gummiindustrie, Friseure u.a. häufiger anzutreffen (22).

Heutzutage gilt das Rauchen von Zigaretten als wichtigster Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom. Dabei korreliert die Anzahl und die Dauer der gerauchten Zigaretten mit dem Krebsrisiko (23,24).

Diesen Zusammenhang untersuchten Brennan et al. im Jahr 2000. Dabei lag die OR nach 20 gerauchten Jahren bei 1,96 (95% Konfidenzintervall (KI): 1,48-2,61) und nach 60 Jahren bei 5,57 (95% KI: 1,48-2,61) (25).

Ein weiterer Risikofaktor sind chronische Entzündungen der Harnblase (26).

Kantor et al. ermittelten in einer Studie mit 2982 Harnblasenkarzinompatienten und 5782 gesunden Kontrollpatienten, dass das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, mit der Anzahl an durchgemachten Blasenentzündungen steigt. Sie konnten zeigen, dass das relative Harnblasenkarzinomrisiko bei Männern, die 1 oder 2 Blaseninfektionen durchgemacht haben, bei 1,5 liegt (95% KI: 1,3-1,8). Bei 3 oder mehr Infektionen in der Anamnese lag das RR bei 2,0 (95% KI: 1,6-2,6). Bei Frauen lagen die Werte ähnlich, bei 1,2 und 2,1 (27).

Auch Strahlentherapie gilt als Harnblasenkarzinogen. Boice et al. fanden 1985 unter Leitung der International Agency for Research on Cancer (IARC) bei 182.040 Frauen, die aufgrund eines Zervixkarzinoms mit Strahlentherapie behandelt wurden, in den ersten 4 Jahren nach Therapie 2,2-mal häufiger Harnblasenkarzinome (28), was von Chaturvedi et al. 2007 bestätigt wurde (29).

1.1.5 Klinik

Die meisten Harnblasenkarzinome fallen durch eine schmerzlose Makrohämaturie auf. Laut der S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms weisen je nach Publikation 68-97,5% der Patienten mit Harnblasenkarzinom eine Makrohämaturie auf, umgekehrt haben 11,3-22% der Patienten mit Makrohämaturie ein Harnblasenkarzinom. Mikrohämaturie spielt ebenfalls eine Rolle in der Tumordiagnostik. Bei 10-15% der Patienten mit einer asymptomatischen Mikrohämaturie lässt sich ein Malignom der Harnblase oder der ableitenden Harnwege finden. Vor allem bei Patienten mit Cis ist die Mikrohämaturie ein häufiges Symptom. Ein weiteres klinisches Zeichen sind irritative Symptome, wie Pollakisurie, Drangsymptomatik oder Dysurie, die bei 20-25% der Patienten mit Harnblasenkarzinom auftreten (30).

1.1.6 Diagnostik

Die wichtigste Untersuchung bei vorhandener Makrohämaturie ist die Zystoskopie. Ergibt sich hierdurch der Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom, so muss durch eine transurethrale Resektion des Blasentumors (TUR-B) die histologische Sicherung erfolgen, was in der Mehrzahl der Fälle gleichzeitig die Therapie darstellt. Ergänzend muss per Sonographie und in bestimmten Fällen radiologisch (Ausscheidungsurogramm oder CT) der obere Harntrakt abgeklärt werden (31).

Ferner kann eine Urinzytologie bei Verdacht auf Cis, G3 oder high-grade Tumore durchgeführt werden. Abgeschilferte maligne Urothelzellen können im Urin nachgewiesen werden, was insbesondere bei Cis oder kleinen Tumoren des oberen Harntraktes von Relevanz ist. Die Sensitivität der Urinzytologie ist bei G3 Tumoren hoch, bei low-grade Tumoren jedoch deutlich geringer (32).

Raisi et al. stellten in einer retrospektiven Untersuchung eine Übereinstimmung der urinzytologischen und histologischen Diagnose von 92% fest (33). Allerdings ist die urinzytologische Untersuchung und ihre Sensitivität sehr stark untersucherabhängig (32). Im Falle von muskelinvasivem Blasenkarzinom oder Tumoren des oberen Harntraktes wird darüber hinaus ein CT oder MRT des Abdomens, ein CT Thorax und ggf. eine retrograde Ureteropyelographie durchgeführt.

Ein Schädel CT oder eine Knochenszintigraphie erfolgen nur bei klinischem Verdacht oder sehr fortgeschrittenem Tumor (34).

1.2 Das nicht-muskelinvasive Blasenkarzinom (NMIBC)

1.2.1 Therapie des NMIBC

Standardtherapie des NMIBC ist die transurethrale Blasentumorresektion. Die Resektion sollte dabei in toto erfolgen und Detrusormuskel einschließen (35).

Die fluoreszenzbasierte TUR-B nach präoperativer Instillation von Hexylaminolaevulinat hat dabei eine höhere Tumor-Detektionsrate im Vergleich zur konventionellen Weißlicht TUR-B (36).

1.2.2 Nachresektion bei NMIBC

In bestimmten Fällen sollte nach 2-6 Wochen eine Nachresektion erfolgen (37). Das Ziel der Nachresektion ist es, eventuell übersehene Resttumore zu reseziieren und ein doch vorhandenes invasives Wachstum nicht zu übersehen (38,39). Zurkirchen et al. zeigten die häufige Persistenz von Tumorgewebe nach Erstresektion selbst bei erfahrenen Operateuren (40).

Die S3-Leitlinie empfiehlt eine TUR-B Nachresektion (41):

1. Bei Tumoren, bei denen die primäre TUR inkomplett war
2. wenn in der initialen TUR kein Muskel im histopathologischen Präparat nachweisbar war, außer pTa low-grade
3. bei pT1-Tumoren
4. bei allen high-grade Tumoren, mit Ausnahme der Patienten mit primärem Carcinoma in situ (pTis).

1.2.3 Intravesikale Instillationstherapie

Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine Chemoinstillation nach durchgeführter TUR-B sowohl bei Ta, als auch bei T1 Tumoren die Rezidivrate deutlich reduzieren kann. Dabei kann sowohl die Rezidivrate verringert, als auch der Zeitraum bis zum Auftreten des ersten Rezidivs verlängert werden (42,43).

Solsona et al. zeigten, dass die Rezidivrate durch Chemoinstillation vor allem im ersten Jahr nach TUR gesenkt werden kann (44).

Ein Einfluss auf die Progressionsrate ist laut Leitlinie aufgrund fehlender randomisierter Studien oder Metaanalysen momentan nicht eindeutig zu beurteilen (45).

Bei low-risk Tumoren reicht eine einmalige Frühinstillation innerhalb von 24 Stunden postoperativ aus. Als Chemotherapeutika werden meist Epirubicin oder Mitomycin C (MMC) verwendet (46,47). Eine adjuvante Chemotherapie-Instillations-Therapie wird zusätzlich zur Frühinstillation bei low-risk Tumoren aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen nicht empfohlen (48).

Bei intermediate-risk Tumoren wird zusätzlich zur Frühinstillation eine Langzeitprophylaxe empfohlen. Diese kann als Chemotherapie-Instillation oder als

Instillationstherapie mit Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) durchgeführt werden (47,49,50).

Laut Leitlinie sollte ein intermediate-risk Urothelkarzinomrezidiv mit einer adjuvanten BCG Therapie 1 Jahr lang behandelt werden. Die Therapie besteht aus einer Induktionstherapie mit 6 wöchentlichen Instillationen gefolgt von 3 wöchentlichen Gaben nach 3, 6 und 12 Monaten als Erhaltungstherapie (51).

High-risk Tumore werden, wenn keine Frühzystektomie indiziert ist, ebenfalls mit einer BCG-Instillationstherapie weiterbehandelt. Dabei folgen auf die jährliche Instillationstherapie weitere 3 wöchentliche BCG Instillationen nach 18, 24, 30 und 36 Monaten (52).

Beim isolierten Cis wird eine BCG-Induktions- und Erhaltungstherapie empfohlen. Alternativ kann eine radikale Zystektomie in Erwägung gezogen werden (53).

1.2.4 Frühzystektomie

Bei MIBC ist die radikale Zystektomie aufgrund der fehlenden transurethralen Sanierbarkeit die Standardtherapie.

Auch beim NMIBC kann eine Zystektomie indiziert sein, wenn das Progressions- und Rezidivrisiko im Zuge eines Hochrisiko-NMIBC erhöht ist.

In folgenden Situationen sollte mit dem Patienten eine Frühzystektomie diskutiert werden (54):

- multifokale und/oder > 3 cm messende pT1 high grade/G3 NMIBC im TUR-Präparat
- pT1 high grade/G3 NMIBC im TUR- Präparat mit begleitendem Cis
- der Befund eines pT1 high grade /G3 NMIBC im TUR-Präparat nach BCG-Induktionstherapie in der Dreimonats-Kontrolle, dem sog. „Frührezidiv“, welches einem Versagen der BCG-Therapie entspricht.
- das Rezidiv eines pT1 high grade /G3 NMIBC im TUR-Präparat unter laufender BCG-Erhaltungstherapie oder nach abgeschlossener BCG-Therapie.

Die Regensburger Arbeitsgruppe um Denzinger et al. untersuchten den Einfluss der Frühzystektomie im Vergleich zur verzögerten Zystektomie auf das tumorspezifische Überleben von high-risk pT1G3 Blasenkarzinompatienten. Um in die Studie eingeschlossen zu werden, musste bei den Patienten zum einen eine radikale Therapie klinisch sinnvoll sein und zum anderen mindestens zwei Risikofaktoren (Tumor > 3 cm; multifokaler Tumor; konkomittantes Cis) erfüllt sein. Von 105 Patienten erhielten 51% eine Zystektomie. 49% der Patienten ohne Frühzystektomie erhielten nach initialer TUR-B 6 wöchentliche BCG-Instillationen, gefolgt von einer Nachresektion. Das Follow-up erfolgte alle drei Monate durch Zystoskopie. Beim Auftreten eines Rezidivs, einer Progression oder eines Cis wurde eine Zystektomie durchgeführt. Im Median 11,2 Monate nach initialer TUR.

30% der frühzystektomierten Patienten erfuhren ein Upstaging. Das 5- und 10-Jahresüberleben lag bei Patienten mit Frühzystektomie bei 83% und 78% im Vergleich zu 67% und 51% bei Patienten mit verzögerter Zystektomie ($p < 0,01$). Denzinger et al. identifizierten bei high-risk pT1G3 Tumoren vor allem Multifokalität, eine Größe > 3 cm und das Auftreten eines konkomittanten Cis als prognostisch ungünstige Faktoren und damit als Entscheidungshilfen für die Indikation einer Frühzystektomie (55).

Badalato et al. untersuchten ebenfalls die Prognose von Patienten mit high grade T1 Urothelkarzinom, die blasenerhaltend (TUR und Instillation) oder durch Frühzystektomie behandelt wurden. Dabei wurden Patienten mit NMIBC in den Zeiträumen von 1990 bis 2010 verglichen. Obwohl von 2000 bis 2010 42,3% mehr Patienten blasenerhaltend behandelt wurden, als von 1990 bis 1999, änderte sich das 5 Jahresüberleben der Patienten nicht wesentlich (77% vs. 80%, $p = 0,566$). Badalato et al. schlussfolgerten, dass für ausgewählte Patienten eine konservative Therapie eine gute Alternative zur radikalen Zystektomie darstellt. Diese Patienten zu filtern bleibt eine Herausforderung (56).

1.2.5 Nachsorge des NMIBC

Beim NMIBC ist das Rezidivrisiko hoch, bei intermediate- und high-risk Tumoren besteht dazu ein relevantes Progressionsrisiko (Kapitel 1.1.3).

Eine gute Nachsorge ist daher entscheidend, wobei die Zystoskopie hier die Schlüsselrolle einnimmt.

Die Nachsorge des NMIBC erfolgt laut S3-Leitlinie risikostratifiziert (57):

Low-risk:

- Zystoskopie 3 und 12 Monate nach TUR-B
- Bei Rezidivfreiheit folgt eine Untersuchung jährlich
- Nach 5 Jahren ohne Rezidiv kann die Nachsorge beendet werden

Intermediate-risk:

- Zystoskopie im 1. Jahr alle drei Monate
- Im 2. und 3. Jahr alle 6 Monate
- Ab dem 4. Jahr einmal jährlich
- Urinzytologie sollte ergänzend zur Zystoskopie eingesetzt werden

High-risk:

- Zystoskopie in den ersten zwei Jahren alle 3 Monate
- Im 3. und 4. Jahr alle 6 Monate
- Ab dem 5. Jahr einmal jährlich
- Die Urinzytologie sollte zusätzlich eingesetzt werden

1.3 Das muskelinvasive Blasenkarzinom (MIBC)

1.3.1 Therapie

Beim muskelinvasivem Harnblasenkarzinom (MIBC) gilt die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie als Standardtherapie (58, 59). Die Durchführung einer neoadjuvanten oder adjuvanten Chemotherapie kann das Überleben des Patienten bei fortgeschrittenen Stadien verbessern (60). Ihr Einsatz sollte bei Patienten mit MIBC multidisziplinär für jeden Patienten abgewogen werden. Die neoadjuvante Chemotherapie sollte dabei je nach Schema 3-4 Zyklen beinhalten (61).

Der Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie sollte bei der histopathologischen Diagnose eines organüberschreitenden muskelinvasiven ($\geq pT3$) oder regionär lymphatisch metastasiertem ($pN1$) Urothelkarzinom empfohlen werden (62).

Bei Patienten mit MIBC, die aufgrund ihres Allgemeinzustands für eine Zystektomie ungeeignet erscheinen kann als Alternative zur radikalen Zystektomie auch eine TUR-B mit anschließender Radiochemotherapie durchgeführt werden (trimodale Therapie) (63). Frühestens 6 und spätestens 12 Wochen nach Beendigung der Radiochemotherapie sollte eine Zystoskopie und gegebenenfalls eine Re-TUR zum Re-Staging erfolgen (64).

1.4 Notwendigkeit prognostischer Biomarker

Das NMIBC stellt eine sehr heterogene Tumorentität dar. So gehören verhältnismäßig harmlose, primär kleine $pTaG1$ Tumoren ebenso dazu wie multilokuläre, rasch rezidivierende $pT1G3$ Tumoren mit begleitendem Carcinoma in situ, die ein hohes Progressionsrisiko aufweisen. Insbesondere beim high-risk NMIBC wären Einteilungshilfen wünschenswert bezüglich der Frage, welche Patienten von einer Frühzystektomie profitieren und welche mit vertretbarem Risiko blasenerhaltend mittels Instillationstherapie behandelt werden können.

Neben den klassischen klinischen und pathologischen Kriterien, die sich in der Risikoklassifizierung widerspiegeln, wären hier weitere Parameter, z.B. prognostische Biomarker, die es erleichtern, die Prognose des Patienten abzuschätzen und dementsprechend die Therapie optimal zu wählen, wünschenswert.

Bislang wird außerhalb von Studien keine Therapieplanung durch molekulare Tests empfohlen. Lediglich beim nicht-muskelinvasivem Urothelkarzinom kann in Ausnahmefällen die immunhistochemische Färbung des Zytokeratins 20 (CK20), des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Tumorsuppressorgens p53 zur Unterscheidung von low -und high-grade genutzt werden (65).

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 dargestellt, ist die Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit beim NMIBC abhängig von unterschiedlichen

Einflüssen sehr variabel, was die Einschätzung des NMIBC erschwert.

In der Analyse von Sylvester et al. hatten von 2596 Patienten mit NMIBC 1240 Patienten (47,8%) mindestens 1 Rezidiv entwickelt, bei einem medianen Follow-up von 3,9 Jahren. Die mediane Zeit zum Auftreten des ersten Rezidivs betrug 2,7 Jahre. 11% erfuhren dabei eine Progression zum MIBC.

Selbst bei einem berechneten Recurrence Score von 0 liegt die 5 Jahres Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs bei 31%.

Bei einem Recurrence Score >10 kann die Rezidivwahrscheinlichkeit innerhalb von 5 Jahren nach Therapie sogar bis zu 78% betragen.

Die Wahrscheinlichkeit eine Progression innerhalb der nächsten 5 Jahre zu erleiden ist vor allem bei high grade Tumoren mit begleitendem Cis deutlich erhöht und kann bei einem Progression Score von 14-23, bis zu 45% betragen (12).

1.5 Aquaporine

1.5.1 Vorkommen und biologische Funktion

Aquaporine sind eine ubiquitär vorkommende Familie von Proteinen ähnlicher Sequenz und Struktur. Aktuell sind 13 menschliche Aquaporine bekannt. Diese werden in zwei Gruppen eingeteilt, je nachdem, ob sie nur Wasser (AQP0,1,2,4,5,6,8) oder auch Glycerol und kleinere Moleküle (AQP3,7,9,10,12) transportieren können. Aquaporine wurden in den 1990er Jahren von Peter Agre und seinem Team entdeckt. Zunächst AQP1 in roten Blutkörperchen und Nierentubuli (66). Aquaporine kommen in Zellen vor, in denen eine hohe Wasserpermeabilität entscheidend für deren Funktion ist und durch einfache Diffusion nicht gewährleistet werden kann (67). Dabei senken sie die Energie, die für die Diffusion von Wasser durch eine Membran nötig ist, von 10-20 kcal/mol auf 5 kcal/mol, wodurch größere Mengen bewegt werden können (68). Ihr Vorkommen ist daher vielfältig (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vorkommen, Genname und Chromosomlokalisierung der menschlichen Aquaporine; adaptiert nach Magni et al., Proteomic knowledge of human aquaporins. Bd. 6, Proteomics. 2006 (67).

Proteinname	Genname	Chromosom	Vorkommen
AQP0	MIP	12q13	Innenohr
AQP1	AQP1	7p14	Auge, Herz, Lunge, Leber, Darm, Harnblase, Haut, Gehirn, Innenohr, Speicheldrüsen, Pankreas, Niere, Hoden/Nebenhoden, Muskel, Kapillaren
AQP2	AQP2	12q13	Niere, Hoden/Nebenhoden
AQP3	AQP3	9p13	Auge, Lunge, Darm, Harnblase, Haut, Speicheldrüsen, Niere, Hoden/Nebenhoden
AQP4	AQP4	18q22	Auge, Lunge, Gehirn, Innenohr, Magen, Niere, Hoden/Nebenhoden, Muskel, Harnblase
AQP5	AQp5	12q13	Schweißdrüsen, Auge, Lunge, Speicheldrüsen, Pankreas
AQP6	AQP6	12q13	Niere
AQP7	AQP7	9p13	Herz, Darm, Niere, Hoden/Nebenhoden, Fettzellen, Harnblase
AQP8	AQP8	16p12	Leber, Darm, Pankreas, Niere, Hoden/Nebenhoden
AQP9	AQP9	15q22	Leber, Gehirn, Niere, Hoden/Nebenhoden, Harnblase
AQP10	AQP10	1q21	Darm
AQP11	AQP11	11q13	Niere
AQP12	AQP12	2q37	Pankreas, Harnblase

AQP0 dient darüber hinaus als Adhäsionsmolekül zwischen den Linsenfäsern.

AQP1 übernimmt eine Rolle in der Gallen- und Pankreassaftproduktion, sowie in der Absorption von Chylomikronen.

AQP2 ist entscheidend an der Aldosteron-gesteuerten Wasserrückresorption im distalen Tubulus beteiligt (67).

AQP3 spielt eine Hauptrolle in der Osmoregulation im Menschen. Es kommt vielfältig in der basolateralen Membran der Hauptzellen des Sammelrohrs der Niere, in der Basalmembran von Keratinozyten für den Glycerol-Transport und in roten Blutkörperchen vor. Darüber hinaus spielt es eine Rolle im Wassertransport im

weiblichen Genitaltrakt. Es wird außerdem vermutet, dass AQP3 auch eine Rolle in der Osmoregulation der Harnblase spielt (69).

AQP4 spielt eine Rolle beim Transport von Wasser aus dem Blut oder Liquor im Gehirn.

AQP5 sitzt in der apikalen Membran an der luminalen Oberfläche von Speichel- und Tränendrüsen und ist in den Prozess der Speichel-, Tränen-, sowie der Lungensekretion eingebunden. AQP6 lässt auch Anionen passieren und trägt zum Säuretransport im Sammelrohr der Niere bei. AQP7 kommt in Fettzellen vor und spielt eine Rolle in der Glycerolaufnahme und -abgabe in Adipozyten. AQP8 spielt wahrscheinlich zusammen mit AQP7 eine Rolle in der Spermatogenese, sowie in der Wasserrückresorption im Darm. Ebenso ist AQP8 in Hepatozyten, der Niere und der Gallenblase zu finden. AQP9 maximiert die Glycerolaufnahme und die Harnstoffabgabe während der Gluconeogenese und ist bei der Energiehomöostase in katecholaminergen Neuronen eingebunden, wo es durch Insulin reguliert werden kann. AQP10 kommt in den intestinalen Villi vor und spielt eine Rolle im Wassertransport. AQP11 ist in den proximalen Tubuli der Niere zu finden. AQP12 spielt vermutlich eine Rolle in der Exozytose von sekretorischen Vesikeln in pankreatischen Azinuszellen (67).

1.5.2 Auswirkung eines Funktionsverlustes von AQP 1, 2 und 3

Wie bereits beschrieben kommt den Aquaporinen eine entscheidende Rolle in der Ausübung zahlreicher Funktionen unterschiedlicher Gewebe zu. Dementsprechend äußert sich ein Funktionsverlust in unterschiedlichen Erkrankungen, je nachdem welche Kanäle in welchem Gewebe betroffen sind.

Als Beispiel seien Funktionsverluste von AQP 1, 2 und 3 aufgeführt. AQP1 ist ein Protein, das von allen Aquaporinen am häufigsten vorkommt. In der Niere ist AQP1 im proximalen Tubulus und absteigenden Teil der Henle-Schleife an der Harnkonzentrierung beteiligt (70). King et al. konnten zeigen, dass Patienten mit eingeschränkter AQP1 Funktion in der Niere, ihren Urin nach Flüssigkeitsentzug über 24 h lediglich auf ca. 450 mOsm konzentrieren können, bei einem normalen Wert größer 1000 mOsm (71). Deen et al. konnten zeigen, dass Patienten mit einer Mutation im Gen für AQP2,

welches wichtig für die Vasopressin-gestützte Wasserrückresorption in der Niere ist, eine Form des Diabetes insipidus entwickeln (72).

AQP3 ist ein Wasser- und Glycerolkanal. Roudier et al. konnten zeigen, dass eine Mutation im AQP3 Gen den Glyceroltransport durch die Membran von roten Blutkörperchen beeinträchtigt (73).

1.5.3 Rolle von Aquaporinen in Tumoren

Neben der Krankheitsentstehung bei Funktionsverlust spielen Aquaporine auch in der Tumorentstehung eine Rolle. Dabei zeigten Tumore, die AQP mRNA exprimieren, verstärkte Tumormigration in vitro, als auch verstärkte lokale Invasion und Metastasierung in vivo. Aquaporine werden allerdings nicht ausschließlich hochreguliert. Ein Zusammenspiel von erhöhter und erniedrigter Expression unterschiedlicher Aquaporine in Tumoren konnte gezeigt werden (74).

Folgende Arbeiten beleuchten beispielhaft die Auswirkungen unterschiedlicher Aquaporinexpressionen beim Kolonkarzinom, Mamakarzinom, Magenkarzinom und bei Glioblastomen:

Moon et al. konnten 2003 die Expression von Aquaporin 1, 3 und 5 in Kolonkarzinomen nachweisen. Mittels in situ Hybridisierung konnten sie zeigen, dass während der Karzinogenese die AQP1- und 5- Expression früh induziert- und sogar in Metastasen aufrechtgehalten wurde. In normaler Darmmukosa fand sich hingegen keine Expression. Ihre genaue Funktion in den Tumorzellen ist noch nicht sicher geklärt. Ein Vorteil im Zellwachstum und während des Zellzyklus wird vermutet (75).

AQP4 spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Wasser- und Ionenhomöostase aber auch bei der Entstehung von trauma- oder tumorassoziierten Hirnödemen. Ebenso wird vermutet, dass AQP4 eine Rolle bei der Zellmigration in Glioblastomen spielt. Ding et al. zeigten 2011 eine starke Beeinträchtigung der Zellmigration und Invasion von Glioblastomen mit AQP4 knock down in vivo und in vitro (76).

Li et al. untersuchten 2016 die Auswirkung der Herabregulation von AQP4 auf die Proliferation, Migration und Invasivität von Brustkrebs. Dabei konnte ein protektiver Effekt der geringeren AQP4 Expression bei Brustkrebs gezeigt werden (77).

Zhu et al. untersuchten 2017 die Expression von AQP3 und AQP5 in triple-negative breast cancer (TNBC). Dabei konnte eine erhöhte AQP3- und AQP5-Expression in

Karzinomgewebe im Vergleich zu Normalgewebe festgestellt werden. Überexpression von AQP3 und 5 war dabei signifikant mit der Tumorgroße, Lymphknotenstatus und lokalen Metastasen bzw. Fernmetastasen assoziiert. Darüber hinaus zeigten Patienten mit hoher AQP3- und AQP5-Expression ein schlechteres Karzinomspezifisches Überleben (Cancer-specific survival (CSS)). Die Kombination beider Aquaporine war dabei ein prognostischer Marker in TNBC (78). Thapa et al. untersuchten 2018 den prognostischen Wert unterschiedlicher Aquaporine bei Magenkarzinom. Dabei zeigten sie, dass hohe AQP3, AQP9 und AQP11 mRNA-Expressionen mit einem verbesserten Überleben korrelierten (79). Demgegenüber verschlechterten hohe AQP0, AQP1, AQP4 und AQP5-Expressionen das Überleben.

Zusammenfassend scheint Aquaporin 3 je nach Lokalisation und Tumorentität unterschiedlichen Einfluss auf das Outcome von Tumoren ausüben zu können. Beim Magenkarzinom korreliert eine AQP3-Überexpression mit verbessertem CSS und in TNBC mit schlechterem CSS. AQP4 hingegen konnte sowohl bei Glioblastomen, als auch beim Magenkarzinom und beim Mammakarzinom mit einem schlechteren Outcome in Verbindung gebracht werden. Demgegenüber zeigte AQP9 beim Magenkarzinom einen protektiven Effekt.

1.5.4 Rolle der Aquaporine beim Urothelkarzinom

Rubenwolf et al. konnten 2008 AQP3, AQP4, AQP7, AQP9, und AQP11 im Urothel nachweisen. Vor allem AQP3 wurde dabei sowohl in vivo als auch in vitro stark exprimiert (80).

2012 konnten Rubenwolf et al. Aquaporine auch im Urothelkarzinom nachweisen. Dabei konnte auch eine Korrelation zwischen der AQP3-Expression und Tumorinvasivität festgestellt werden. 100% der pTa Tumore exprimierten AQP3. Auf der anderen Seite exprimierte kein MIBC AQP3. 60% der pT1 Tumoren waren AQP3 positiv. Auch im Grading zeigt sich ein Zusammenhang: 100% der G1 Tumoren, 89% der G2 und 28% der G3 Tumoren waren AQP3 positiv (69).

2012 untersuchten Otto et al. den prognostischen Wert der AQP3-Expression in pT1 Tumoren. Von 87 Patienten waren 51 AQP3 positiv und 36 AQP3 negativ. Fehlende Expression war dabei mit einem deutlich schlechteren progressionsfreien Überleben

(20% vs. 72%, $p=0,020$) und auch einem schlechteren rezidivfreien Überleben (22% vs. 60% (nicht statistisch signifikant) assoziiert. Ein statistisch signifikanter Einfluss auf das tumorspezifische Überleben nach 4 Jahren konnte nicht gezeigt werden (81). Zum prognostischen Wert der AQP3-Expression in MIBC publizierten Rubenwolf et al. 2015 eine retrospektive Studie. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine hohe AQP3-Expression im Tumor mit einer statistisch signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (75% vs. 19% $p=0,043$) und tumorspezifischen Überlebens (75% vs. 18% $p=0,030$) einhergeht (82).

2017 zeigten Breyer et al. auch in Cis eine sehr hohe AQP3-Expression. Da Cis zu den schlecht differenzierten Tumorentitäten gehört, lag die Vermutung nahe, dass AQP3 nicht abhängig von der Tumordifferenzierung exprimiert wird, sondern von der Tumorinvasivität (83).

Diese Studien zeigen, dass die AQP3-Expression im Urothelkarzinom einen möglichen prognostischen Biomarker darstellt.

Die genannten Studien lassen vermuten, dass eine geringere AQP3-Expression sowohl beim NMIBC als auch beim MIBC mit einem schlechteren progressionsfreien, als auch rezidivfreien Überleben einhergeht. Ein Expressionsverlust von AQP3 korreliert dabei wahrscheinlich mit zunehmender Tumorinvasivität.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Diese Doktorarbeit baut auf den oben genannten Arbeiten auf. Unter Einschluss von 130 NMIBC Patienten im Stadium pT1 sollte der Zusammenhang zwischen der Aquaporinexpression auf mRNA Ebene und Grading, Staging sowie deren Einfluss auf die Prognose von Patienten mit nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom (NMIBC) der Patienten weiter untersucht werden.

Im Labor wurde dazu die Aquaporin 3, 4, 7 und 9 Expression der pT1 Tumorzellen auf mRNA Ebene durch RTqPCR und Immunfluoreszenz bestimmt. Auf die Messung der NMIBC's pTa und Cis wurde verzichtet, da Breyer et al. (83) in Cis und Rubenwolf et al. (69) in pTa Tumoren bereits eine 100%ige AQP3-Expression nachweisen konnten.

In unsere retrospektive Studie schlossen wir 130 Patienten mit Erstbefund pT1 G2/G3 NMIBC, die im Zeitraum von September 2007 bis November 2015 im Caritaskrankenhaus St. Josef in Regensburg einer TUR-B unterzogen wurden mit

ein. Im Abstand von 2-6 Wochen erfolgte eine Nachresektion. Die retrospektive Erhebung des Follow-up erfolgte zwischen April und Oktober 2017.

Wie bereits in Kapitel 1.4 aufgeführt, stellen pT1 Tumoren eine Herausforderung dar. Die Entscheidung ob blasenerhaltend therapiert werden kann oder eine radikale Zystektomie im Sinne einer Frühzystektomie indiziert ist, fällt schwer. Insbesondere beim high-risk NMIBC wären Einteilungshilfen wünschenswert bezüglich der Frage, welche Patienten von einer Frühzystektomie profitieren und welche mit vertretbarem Risiko blasenerhaltend mittels Instillationstherapie behandelt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau der Messung

Es wurde eine retrospektive Kohortenstudie durchgeführt.

Nach positivem Ethikvotum der Universität Regensburg (Nr.: 16-321-101) wurden 130 Proben von Patienten mit pT1 NMIBC, die Im Zeitraum von 2007 bis 2015 einer TUR-B unterzogen wurden, sowie 5 Proben von normaler Blasenschleimhaut (Normalgewebe in Zystektomiepräparaten) untersucht. Es handelt sich um Erstbefunde. Nach primärer TUR erhielten alle Patienten eine Nachresektion oder eine Frühzystektomie. Das resezierte Blasentumorgewebe der initialen TUR-B wurde als Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) gelagert.

Folgende allgemeine, klinische und pathologische Parameter wurden erhoben:

Tabelle 7: Erhobene allgemeine, klinische und pathologische Parameter.

	Parameter	
Merkmal	Geschlecht	männlich
		weiblich
	Alter	≤75
		>75
	Raucher	aktiv
		nie
		ex
unbekannt		
Diagnostik	PDD	ja
		nein

Befund	Erstbefund	
	Zweitmalignom	Zweitmalignom
		kein Zweitmalignom
Pathologische Parameter	Staging	pT1
	Grading WHO1973	G1
		G2
		G3
	Grading WHO2016	low-grade
		high-grade
	konkomittantes Cis	nein
		ja
	Fokalität	multifokal
		unifokal
	Tumorgröße	<3cm
		≥3cm
EORTC Risk Score	EORTC Recurrence Risk Score	Low
		Intermediate
		High
	EORTC Progression Risk Score	Low
		Intermediate
		High
Therapie	Einfüllungen	keine
		Instillation erfolgt
	Instillationstherapie	MMC
		BCG
		keine
	Behandlung	Frühzystektomie
		sekundäre Zystektomie
		Blasenerhalt
	Überleben	RFS
Rezidiv		
PFS		kein Progress
		Progress
CSS		lebt
		Tod tumorbedingt
		Tod nicht tumorbedingt

Es wurde die mRNA-Expression der Aquaporine 3, 4, 7 und 9 im Resektatgewebe der TUR-B untersucht.

Folgende Housekeepinggene wurden verwendet: TATA Box binding protein 1 (TBP1) und Calmodulin (CALM2).

2.2 Durchführung

2.2.1 Gewebebegewinnung aus Paraffinblöcken

Zunächst wurden die Paraffinblöcke mit einem Mikrotom zugeschnitten.

Pro Labortag wurden 6 Blöcke bearbeitet. Die ersten Schnitte wurden verworfen um dann 5 saubere Schnitte mit einer optimalen Dicke von 10 µM und einer maximalen Größe von 250 mm² in einem Wasserbad (50-60°C) zu sammeln und auf Objektträger zu ziehen.

Die Schnitte wurden anschließend bei 75°C für 30 Minuten inkubiert.

Um das Paraffin aus den Schnitten zu lösen wurden diese zweimal für 10 Minuten in Xylol und zweimal in 100%igen Alkohol platziert. Zur Tumorgewebsgewinnung wurden die Objektträger mittels Skalpell mikrodissiziert. Das Tumorgewebe wurde in ein 1,5 ml Cup gegeben und nach anschließender Zentrifugation setzte sich das Gewebe am Boden ab.

2.2.2 RNA Isolierung mit miRNA FFPE Kit Quiagen¹

Zum Zellaufschluss und Proteinverdau wurden 150 µl Proteinase K Digest Buffer (Buffer PKD) in die Cups hinzugeben, um optimale Bedingungen für die Proteinkinase K² zu schaffen. Nach Zugabe von 30 µl Proteinase K wurden die Cups für 60 Minuten bei 1.300 rpm und 56°C inkubiert.

Um die Crosslinks zwischen Formalin und der RNA zu brechen, wurden die Proben bei 80°C für 15 Minuten inkubiert (wichtiger Schritt für RNA Qualität). Danach wurden die Proben 3 Minuten auf Eis inkubiert und runtergekühlt.

¹ Handbuch online: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=02759997-574c-4e9b-8758-6071c6df282d&lang=en> – letzter Download 13.08.2018 Cat.No.: 217504

² Serinprotease – spaltet Peptidbindung

Zur Fällung der RNA wurden die Proben 15 Minuten bei 4°C und 13.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit der enthaltenen RNA und DNA wurde in ein neues 2 ml Cup pipettiert.

Um ideale Bedingungen für den Verdau der DNA durch DNase I zu schaffen wurden 16 µl DNase Booster Buffer in das Cup hinzugeben.

10 µl DNase I (bei -20° aliquotiert) wurden hinzugeben und das Cup vorsichtig gewendet und anschließend runterzentrifugiert.

Das Cup wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die genomische DNA zu verdauen.

Um die RNA aus dem Cup zu isolieren wurde eine RNeasy MinElute Säule verwendet.

Um die RNA zu binden wurden zunächst 320 µl RBC Buffer zur Lösung hinzugeben. Anschließend wurden 1.120 µl 100% Ethanol hinzugegeben, um die RNA zu fällen. 700 µl der Lösung wurden auf die RNeasyMinElute Säulchen pipettiert. Diese wurden dann 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, bis die Flüssigkeit aus dem Cup komplett über die Säulchen gelaufen war.

Zur Aufreinigung der RNA gab man 500 µl RPE Buffer (Waschpuffer) auf die Säule. Diese wurde 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend setzte man die Säulchen vorsichtig auf ein neues Collection Tube. Dabei musste man darauf achten, dass die Säulchen mit dem Durchlauf nicht mehr in Berührung kamen, um eine Verschleppung des Ethanol zu verhindern. Um die Membran des Säulchens zu trocknen, musste nochmals 5 Minuten „full speed“ mit offenem Säulchen zentrifugiert werden. Das Säulchen setzte man in ein 1,5 ml Collection Tube. Nach Hinzufügen von 20 µl RNase free H₂O direkt auf die Membran zentrifugierte man 1 Min „full speed“.

2.2.3 RNA UV-Messung mit Thermo Scientific Nano Drop 2000c

Zur RNA Quantifizierung wurde bei den Proben eine UV-Spektroskopie durchgeführt. Durch die Messung ergab sich ein Richtwert für die RNA Menge, die für die PCR zur Verfügung stand. Zunächst wurde eine Nullwertmessung mit RNase freiem Wasser durchgeführt. Danach wurden die 6 Proben gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden pro Probe 50 ng/µl RNA in die PCR eingesetzt. Die RNA Proben wurden dementsprechend verdünnt, sodass die in der PCR verwendeten 2 µl RNA Lösung 100 ng RNA enthielten. Allerdings waren die Messungen nur ein ungefähres Maß für die RNA Konzentration, da bei 260 nm auch Nukleotide, ssDNA und dsDNA absorbieren. Daher sind die Reinheit und ein zuverlässiges Arbeiten in den Schritten zuvor sehr wichtig. Die Messung der Housekeepinggene bietet später ebenfalls eine Kontrollmöglichkeit, ob sauber gearbeitet wurde.

2.2.4 PCR mit BIO RAD iTaq Universal Probes One Step Kit³

2.2.4.1 Vorbereitung der PCR

Nach der Gewinnung der RNA aus den Paraffinblöcken wurde eine RT-qPCR (Reverse Transkriptase - quantitative Echtzeit-PCR) durchgeführt.

Bei der RT-PCR wird mRNA zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die entstehende cDNA dient dann als Matrize für die PCR. Die verwendeten Primer in der PCR binden spezifisch an die cDNA, die nachgewiesen werden soll. Also an die cDNA, die für AQP3, 4, 7, 9 und die Housekeepinggene CALM2 und TBP1 kodiert. Für die PCR wurde das iTaq Universal Probes One Step Kit verwendet. Farbstoff-markierte Primer ermöglichten die Messung der RNA-Abschnitte von Interesse (84).

³ <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10032046.pdf>
Zuletzt aufgerufen am 12.07.2017 Bestellnummer: 172-5140
Enthält: iScript advanced reverse transcriptase/ RNase H+MMLV enzyme/ RNase inhibitors/ iTaq universal probes reaction mix

Primersequenzen von AQP3, 4, 7, 9 und der Housekeepinggene CALM2 und TBP1:

AQP3-for TGC TAC CTA CCC CTC TGG AC

AQP3-rev GCC AGC ACA CAC ACG ATA AG

AQP4-for TGG ACC TGC AGT TAT CAT GGG

AQP4-rev CAG CGA GGA CAG CTC CTA TG

AQP7-for TTG GGT TTT GGC TTC GGA GT

AQP7-rev CAG CGC ACA GTT AGC AAA GG

AQP9-for TGA GTT CTT GGG CAC GTT CA

AQP9-rev ATG ACC CCT CCA AAA CGT CC

CALM2-1for TGC AGC ATG GTT AGC TTT GT

CALM2-1rev AGT CAG TTG GTC AGC CTT GC

TBP1-for TAA GAG AGC CAC GAA CCA CG

TBP1-rev CTG CCA GTC TGG ACT GTT CT

Zunächst wurde der iTaq universal probes reaction mix und die anderen Reaktionskomponenten bei 4°C aufgetaut und abgeschirmt von Licht auf Eis gelagert. Für die Durchführung der PCR wurde ein Master Mix aus folgenden Reagenzien angesetzt (Tabelle 8):

Tabelle 8: Inhalt des Master Mixes.

Reagenzien	Pro Well	Mastermix für 17 Proben
H ₂ O	2,25 µl	38,25 µl
Probe	0,50 µl	8,50 µl
2 xiTaqUniv.Probes reaction mix	5,00 µl	85,00 µl
iScript adv Rev Tr.	0,25 µl	4,25 µl
Gesamtvolumen	8 µl	136,00 µl

Benötigt wurde der Mastermix für 16 Proben. Ein zusätzlicher wurde jeweils zur Sicherheit angefertigt.

In 6 Cups gibt man folgende Reagenzien in angezeigten Mengen:

RNAse freies Wasser: **38,25 µl**

iTaq universal probes reaction mix⁴ (2x konzentriert): **85,00 µl**

Probes (Sonde) & forward and reverse primers⁵: **8,50 µl**

→Pro Cup einer der folgenden Primer: CALM2, TBP1, AQP3, AQP4, AQP7, AQP9

iScript advanced reverse transcriptase:⁶ **4,25 µl**

Jeweils 8 µl des jeweiligen Master Mix wurden in die dem zugegebenen Primer (CALM2, TBP1, AQP3, 4, 7 oder 9) entsprechenden Felder der 96 Well Platte pipettiert (Abb. 1). Zu den angesetzten 8 µl wurden jeweils 2 µl RNA, der 6 zu testenden Proben hinzugegeben. Jede Reihe entsprach der mRNA einer Gewebeprobe eines Patienten (A-F). Jede Messung wurde doppelt durchgeführt (1 und 2, 3 und 4, etc. enthielten dieselbe mRNA). Die Positivkontrolle entsprach einer RT4 Zelllinie⁷. Die Negativkontrolle (No template control NTC) enthielt nur den Master Mix ohne hinzugegebene RNA. Anschließend wurde die 96 Well Platte kurz zentrifugiert und in das PCR Gerät⁸ eingesetzt.

⁴ Enthält: hot-start Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, enhancers, stabilizers.

⁵ Von Thermofischer

⁶ RNase H+MMLV Enzyme

⁷ Firma CLS, RT4 Cryovial Bestellnr.: 300326

⁸ Biorad CFX Connect

http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/ltr/literature/Bulletin_6105.pdf
Zuletzt aufgerufen am: 12.07.2017

Dateiname:		Blase_Breyer_Lauf11_05_07_17					
	1	2	3	4	5	6	
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	CALM2 5368/06/C8 No	CALM2 5368/06/C8 No	TBP1 5368/06/C8 No	TBP1 5368/06/C8 No	AQP3 5368/06/C8 No	AQP3 5368/06/C8 No	
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	CALM2 7398/06/C34 No	CALM2 7398/06/C34 No	TBP1 7398/06/C34 No	TBP1 7398/06/C34 No	AQP3 7398/06/C34 No	AQP3 7398/06/C34 No	
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	CALM2 25533/11	CALM2 25533/11	TBP1 25533/11	TBP1 25533/11	AQP3 25533/11	AQP3 25533/11	
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	CALM2 26456/11	CALM2 26456/11	TBP1 26456/11	TBP1 26456/11	AQP3 26456/11	AQP3 26456/11	
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	CALM2 28473/11	CALM2 28473/11	TBP1 28473/11	TBP1 28473/11	AQP3 28473/11	AQP3 28473/11	
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	CALM2 187/12	CALM2 187/12	TBP1 187/12	TBP1 187/12	AQP3 187/12	AQP3 187/12	
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	CALM2 Pos.Kon. RT4	CALM2 Pos.Kon. RT4	TBP1 Pos.Kon. RT4	TBP1 Pos.Kon. RT4	AQP3 Pos.Kon. RT4	AQP3 Pos.Kon. RT4	
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	
	CALM2 H2O	CALM2 H2O	TBP1 H2O	TBP1 H2O	AQP3 H2O	AQP3 H2O	
				Programm:	One Step Probe 60°C		
	7	8	9	10	11	12	
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	AQP4 5368/06/C8 No	AQP4 5368/06/C8 No	AQP7 5368/06/C8 No	AQP7 5368/06/C8 No	AQP9 5368/06/C8 No	AQP9 5368/06/C8 No	
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	AQP4 7398/06/C34 No	AQP4 7398/06/C34 No	AQP7 7398/06/C34 No	AQP7 7398/06/C34 No	AQP9 7398/06/C34 No	AQP9 7398/06/C34 No	
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	AQP4 25533/11	AQP4 25533/11	AQP7 25533/11	AQP7 25533/11	AQP9 25533/11	AQP9 25533/11	
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	AQP4 26456/11	AQP4 26456/11	AQP7 26456/11	AQP7 26456/11	AQP9 26456/11	AQP9 26456/11	
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	AQP4 28473/11	AQP4 28473/11	AQP7 28473/11	AQP7 28473/11	AQP9 28473/11	AQP9 28473/11	
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	AQP4 187/12	AQP4 187/12	AQP7 187/12	AQP7 187/12	AQP9 187/12	AQP9 187/12	
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	
	AQP4 Pos.Kon. RT4	AQP4 Pos.Kon. RT4	AQP7 Pos.Kon. RT4	AQP7 Pos.Kon. RT4	AQP9 Pos.Kon. RT4	AQP9 Pos.Kon. RT4	
	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	
	AQP4 H2O	AQP4 H2O	AQP7 H2O	AQP7 H2O	AQP9 H2O	AQP9 H2O	

Abb. 1: Beispiel einer Messreihe einer 96 Wells Platte; Übersicht aus Biorad CFX Manager Software.

2.2.4.2 Durchführung der PCR

Die PCR dauerte ca. 1 Stunde 20 Minuten. Unter Verwendung der Biorad Cfx manager software wurden 50 Zyklen durchlaufen.

Zunächst wurde bei 50°C für 10 Minuten die gewonnene RNA durch die iScript advanced reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Es folgte bei 95°C für 3 Minuten und 10 Sekunden die Denaturierung der cDNA. Die doppelsträngige cDNA wird durch die Temperaturerhöhung in zwei Einzelstränge denaturiert.

Bei 60°C für 45 Sekunden binden die Forward Primer, Reverse Primer und Probe (Sonde) an den komplementären RNA Strang während der PCR. An die Probe (Sonde) sind zwei Komponenten gebunden. Am 5'-Ende befindet sich der Reporter FAM, der Fluoreszenz erzeugt, wenn die Taq Polymerase auf die Probe trifft und den Quencher vom Reporter trennt. Am 3'-Ende bindet der MGB (Minor groove binder) nonfluorescent Quencher. Dieser nimmt Energie vom Reporter auf, wenn dieser durch Licht angeregt wird. Dadurch verhindert er eine sichtbare Fluoreszenz in Abwesenheit der Aktivität der Taq Polymerase (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer).⁹

Die Taq Polymerase synthetisiert jeweils komplementäre DNA-Stränge. Wenn die Polymerase die TaqMan Probe erreicht, trennt sie mit ihrer 5'Nukleaseaktivität den Quencher vom Reporter, der nun angeregt von Licht fluoresziert, was vom System wahrgenommen wird. Je mehr Produkt entsteht, desto mehr Fluoreszenz entsteht proportional dazu. Der Punkt, an dem die Fluoreszenz vom System wahrgenommen wird und anfängt exponentiell zu steigen, ist der Cq Wert. Wenn alle Anfangsreagenzien aufgebraucht sind, bzw. ein Anfangsreagenz limitierender Faktor wird und nicht mehr Produkt entstehen kann, wird die Plateauphase erreicht. Je mehr getestete mRNA anfangs vorhanden war, desto früher entsteht Fluoreszenz (niedriger Cq Wert), die schon nach wenigen Zyklen vom Gerät wahrgenommen werden kann.

Die gemessenen Cq Werte der Aquaporinexpressionen müssen allerdings noch normiert und gegen die Werte der Housekeepinggene gerechnet werden.

⁹ TaqMan Gene Expression Assay solutions - <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-gex-brochure.pdf>. Aufgerufen am 07.07.2017

2.2.5 Berechnung der normierten Cq Werte

50 Zyklen wurden durchlaufen und die medianen Cq Werte der vier zu messenden Aquaporine 3, 4, 7 und 9 (Marker), sowie der zwei Housekeepinggene CALM2 und TBP1 (Referenzgene REF) für jede Probe (S), bestimmt. Da Calmodulin kontinuierlicher nachzuweisen war und höhere Expressionen als TBP1 aufwies, wurde bei der Berechnung der ΔCq Werte lediglich CALM2 als Referenzgen angewendet.

Die medianen Cq Werte wurden gegen den Mittelwert der REF Expression genormt, um Variationen auszugleichen. Die endgültigen Werte wurden generiert indem ΔCq von der totalen Anzahl an Zyklen abgezogen wurde. Dadurch wurde sichergestellt, dass die normalisierte Genexpression, die durch den Test gemessen wurde, proportional zum korrespondierenden mRNA Level ist. So entsprechen in unserer Analyse niedrige ΔCq Werte, niedrigen Aquaporin Expressionen.

Formel:

$$50 - \Delta Cq(AQP3)S = 50 - (Cq[AQP3]S - \text{mean}Cq[REF]S) \quad (85)$$

2.3 Beispielgraphiken der mRNA Messungen

Im Folgenden sieht man Beispielgraphiken der mRNA Messungen. Es sind die „relative fluorescence units“ (RFU) in Abhängigkeit von der Zyklenzahl dargestellt. Am Punkt Cq steigt die RFU primär exponentiell, um dann nach Verbrauch der Substrate ein Plateau zu erreichen (Abb. 2 bis 7).

2.3.1 Messung der Housekeepinggene

2.3.1.1 TBP1

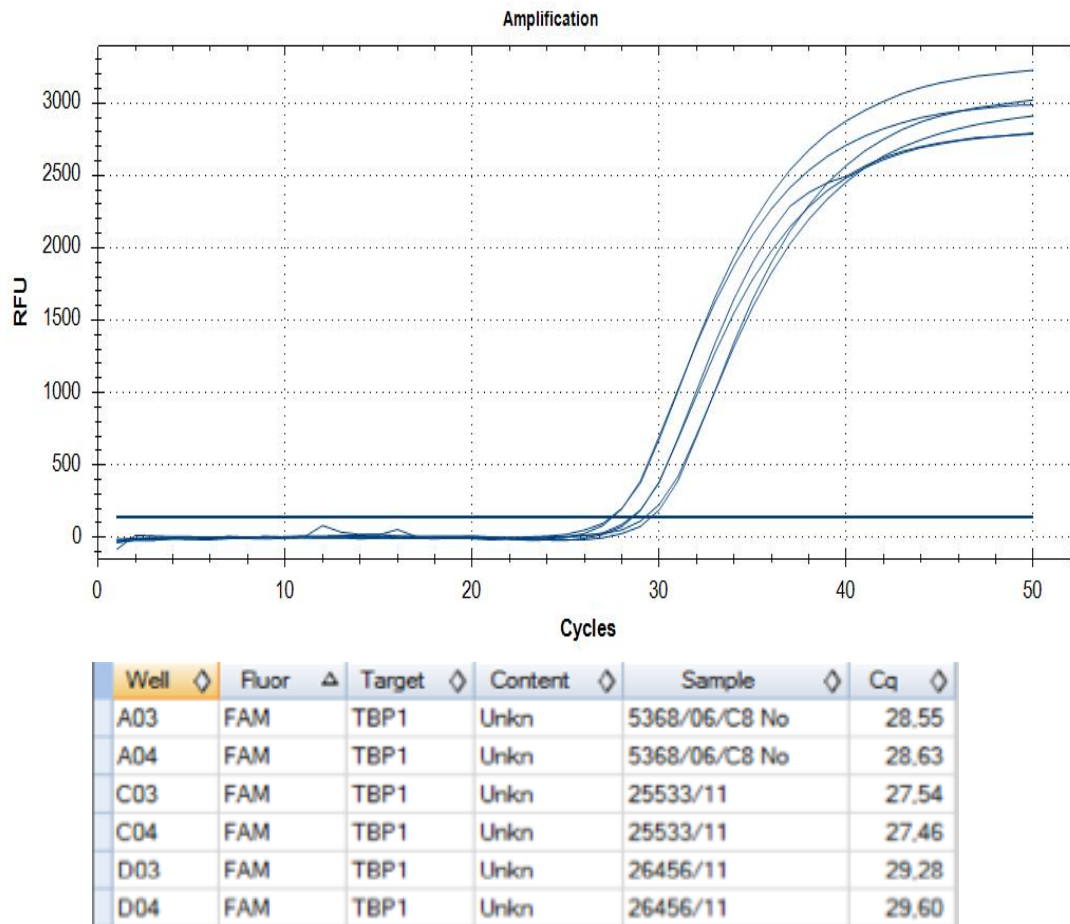
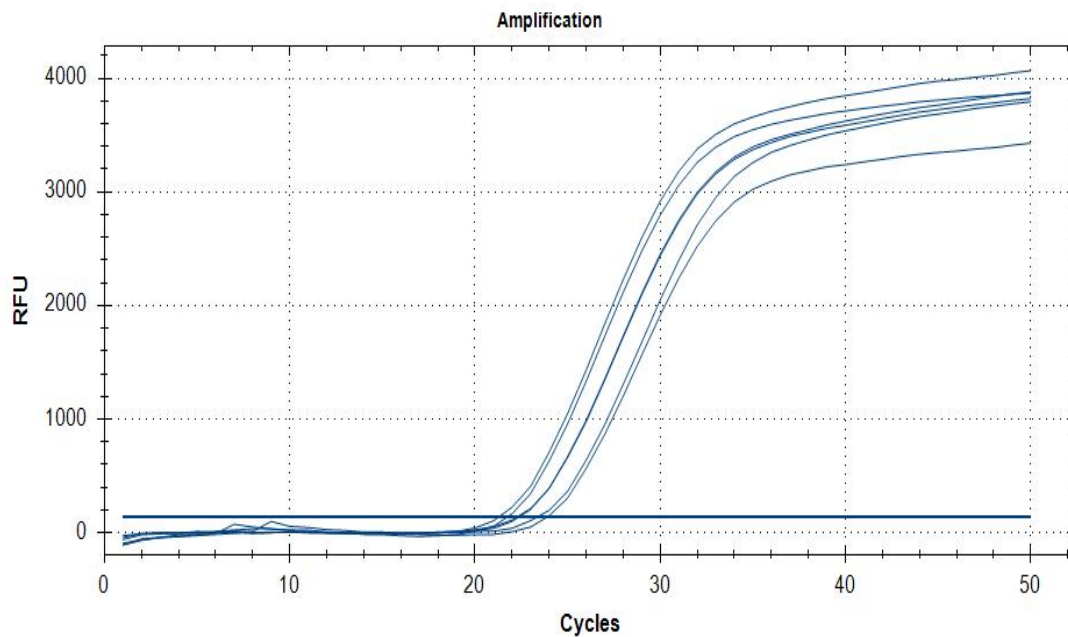


Abb. 2: Screenshots aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU (relative fluorescence unit) in Abhängigkeit der Zyklen einer TBP1 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well A, C und D.

2.3.1.2 CALM2

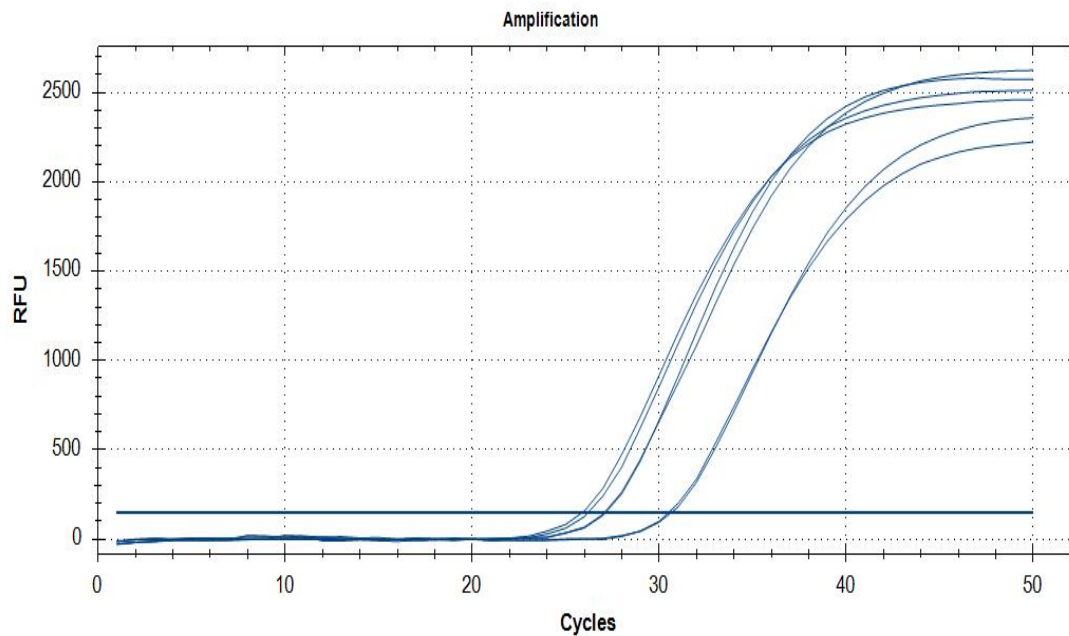


Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	FAM	CALM2	Unkn	5368/06/C8 No	22.42
A02	FAM	CALM2	Unkn	5368/06/C8 No	22.32
C01	FAM	CALM2	Unkn	25533/11	21.33
C02	FAM	CALM2	Unkn	25533/11	21.79
D01	FAM	CALM2	Unkn	26456/11	23.95
D02	FAM	CALM2	Unkn	26456/11	23.42

Abb. 3: Screenshots aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer CALM2 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well A, C und D.

2.3.2 Messung der Aquaporine

2.3.2.1 Messung AQP3



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
C05	FAM	AQP3	Unkn	25533/11	26,16
C06	FAM	AQP3	Unkn	25533/11	25,83
D05	FAM	AQP3	Unkn	26456/11	30,45
D06	FAM	AQP3	Unkn	26456/11	30,60
E05	FAM	AQP3	Unkn	28473/11	27,09
E06	FAM	AQP3	Unkn	28473/11	27,04

Abb. 4: Screenshot aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP3 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well C, D und E.

2.3.2.2 Messung AQP4

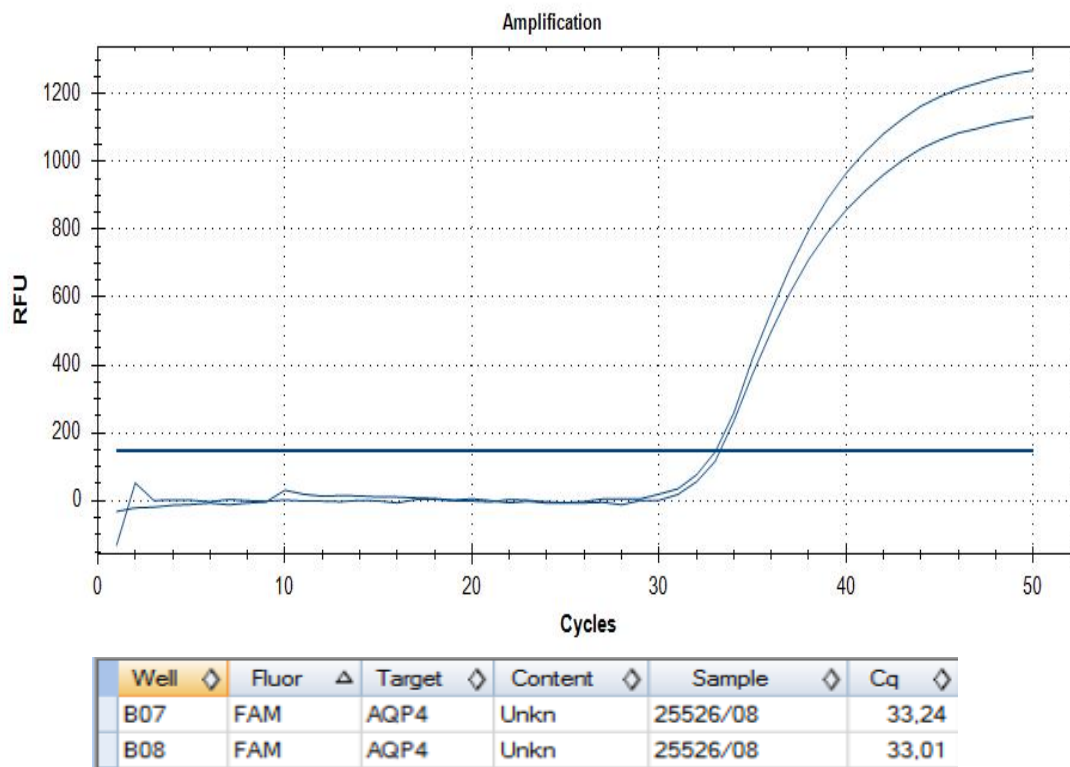
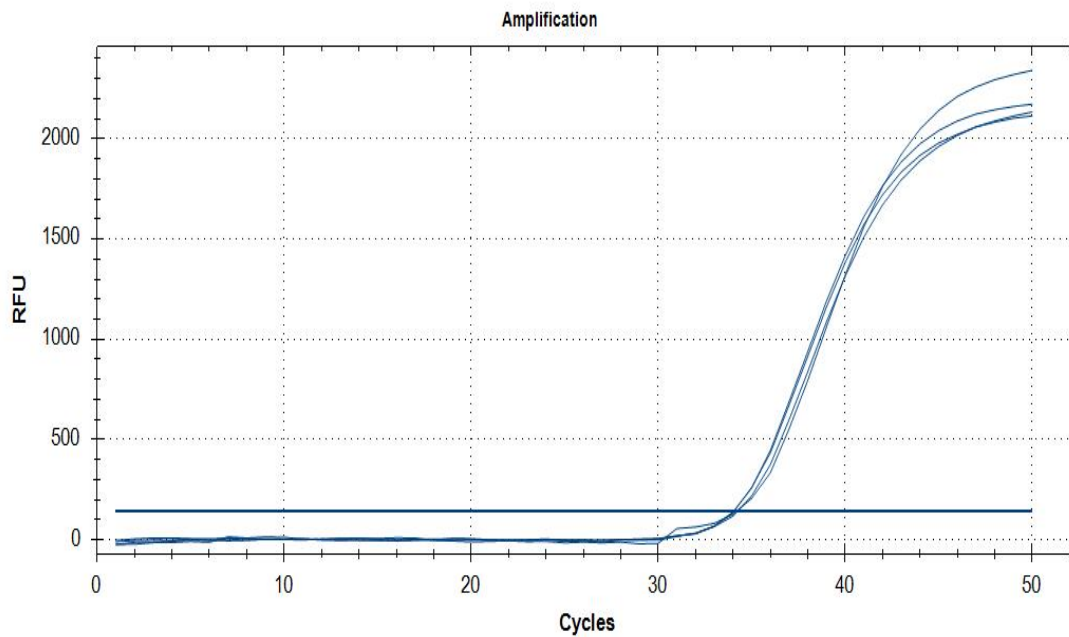


Abb. 5: Screenshot aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP4 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well B.

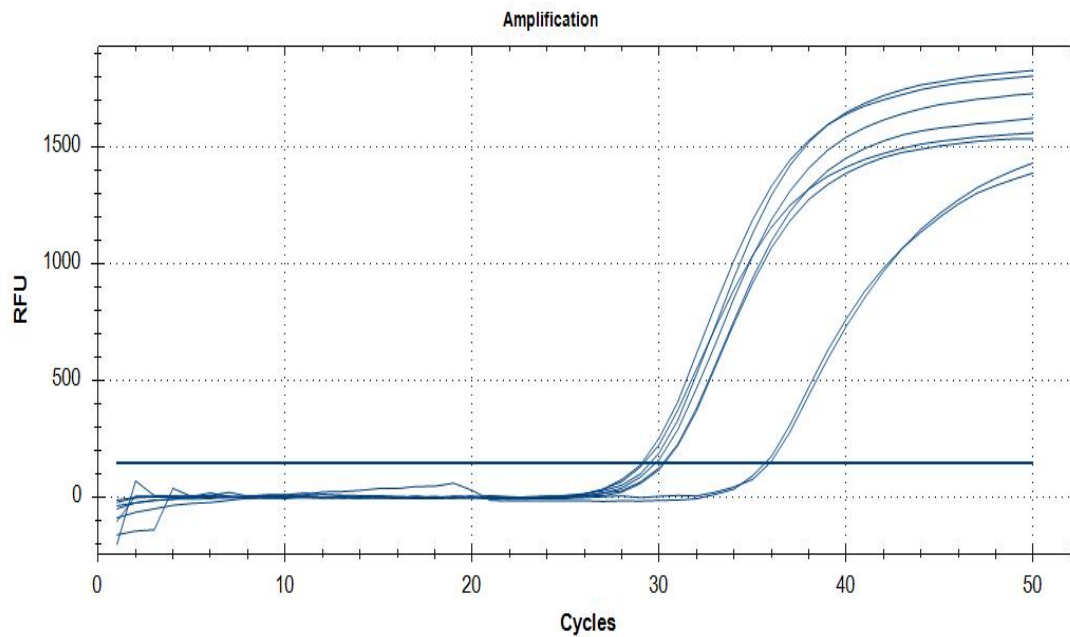
2.3.2.3 Messung AQP7



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
C09	FAM	AQP7	Unkn	25533/11	34.22
C10	FAM	AQP7	Unkn	25533/11	34.26
F09	FAM	AQP7	Unkn	187/12	34.06
F10	FAM	AQP7	Unkn	187/12	34.07

Abb. 6: Screenshot aus der Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP7 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well C und F.

2.3.2.4 Messung AQP9



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A11	FAM	AQP9	Unkn	5368/06/C8 No	29.07
A12	FAM	AQP9	Unkn	5368/06/C8 No	29.16
C11	FAM	AQP9	Unkn	25533/11	29.50
C12	FAM	AQP9	Unkn	25533/11	29.80
D11	FAM	AQP9	Unkn	26456/11	35.90
D12	FAM	AQP9	Unkn	26456/11	35.65
F11	FAM	AQP9	Unkn	187/12	30.27
F12	FAM	AQP9	Unkn	187/12	30.19

Abb. 7: Screenshot aus der Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP9 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well A, C, D und F.

2.4 Statistische Auswertung

Die erhobenen Parameter im Follow-up, sowie die gemessenen AQP Konzentrationen wurden in einer Excell Tabelle zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von IBM SPSS Version 25 (2017). Mittels der Spearman-Korrelation erfolgte die Korrelation der mRNA-Expressionen mit den klinischen und pathologischen Parametern.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse wurde das Karzinomspezifische Überleben (cancer-specific survival, CSS), das progressionsfreie Überleben (progression-free survival, PFS) und das rezidivfreie Überleben (recurrence-free survival, RFS) analysiert. Bei allen statistischen Tests wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ festgesetzt. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant und p-Werte $<0,001$ als statistisch hochsignifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtkohorte

3.1.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von 2007 bis 2015 konnten 130 Patienten mit einem Erstbefund eines pT1 NMIBC identifiziert werden. Bei 13 Patienten (10,0%) war nicht genügend Gewebe zur mRNA-Bestimmung vorhanden. Somit konnte das Gewebe von 117 Patienten untersucht und die mRNA gemessen werden.

Von den 117 verwertbaren Patienten waren 99 männlich und 18 weiblich. Im histopathologischen Grading nach WHO1973 wurden 34 Tumore G2 und 83 als G3 eingestuft. 48 Tumore wiesen ein konkomittantes Cis auf, 46 Tumore waren unifokal und 71 multifokal.

Das Follow-up wurde im Zeitraum von April bis Oktober 2017 erhoben. Bei 40 Patienten wurde im Verlauf histologisch ein Rezidiv gesichert, bei 18 Patienten ein Progress zu einem MIBC. 15 Patienten verstarben tumorbedingt, weitere 16 Patienten verstarben nicht tumorbedingt und 86 lebten am Ende des Follow-up (Tabelle 9).

Tabelle 9: Deskriptive Statistik der Gesamtkohorte.

	Parameter		Häufigkeit	Prozent
Merkmal	Geschlecht	männlich	99	84,6%
		weiblich	18	15,4%
	Alter	≤75	75	64,1%
		>75	42	35,9%
	Raucher	aktiv	30	25,6%
		nie	25	21,4%
		ex	42	35,9%
unbekannt		20	17,1%	
Diagnostik	PDD	nein	33	28,2%
		ja	84	71,8%
Befund	Erstbefund		117	100%
	Zweitumor	Zweitumor	28	23,9%
		kein Zweitumor	89	76,1%
Pathologische Parameter	Staging	pT1	117	100,0%
	Grading WHO1973	G2	34	29,1%
		G3	83	70,9%
	Grading WHO2016	low-grade	7	6,0%
		high-grade	102	87,2%
		fehlend	8	6,8%
	konkomittantes Cis	nein	69	59,0%
		ja	48	41,0%
	Fokalität	multifokal	71	60,7%
		unifokal	46	39,3%
	Tumorgroße	<3cm	56	47,9%
≥3cm		61	52,1%	
Klinische Parameter	EORTC Recurrence Risk Score	Low	1	0,8%
		Intermediate	98	83,8%
		High	18	15,4%
	EORTC Progression Risk Score	Intermediate	5	4,3%
		High	112	95,7%
Therapie	Instillationen	keine	32	27,4%
		Instillation erfolgt	85	72,6%
	Instillationstherapie	MMC	20	17,1%
		BCG	65	55,6%
		keine	32	27,3%

	Behandlung	Frühzystektomie	13	11,1%
		sekundäre Zystektomie	11	9,4%
		Blasenerhalt	93	79,5%
Überleben	RFS	kein Rezidiv	77	65,8%
		Rezidiv	40	34,2%
	PFS	kein Progress	99	84,6%
		Progress	18	15,4%
	CSS	lebt	86	73,5%
		Tod tumorbedingt	15	12,8%
Tod nicht tumorbedingt		16	13,7%	

3.1.2 AQP-Expression in der T1 NMIBC Kohorte

Von diesen 117 Proben konnte bei 116 (99,1%) AQP3, bei 54 (46,2%) AQP4, bei 102 (87,2%) AQP7 und bei 114 (97,4%) AQP9 in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Bei den fehlenden Proben konnte jeweils keine oder eine zu geringe RNA Menge nachgewiesen werden.

Folgende ΔCq Werte wurden ermittelt (Tabelle 10):

Tabelle 10: Errechnete ΔCq Werte der mRNA Messungen der Aquaporine 3,4,7 und 9.

		AQP3	AQP4	AQP7	AQP9
	Gültig	116	54	102	114
	Fehlend	1	63	15	3
Mittelwert		45,64	33,87	37,84	40,30
Median		45,78	33,73	37,94	40,38
Minimum		41,02	30,40	29,30	32,95
Maximum		51,06	41,33	45,38	46,01
Perzentile	25	43,98	32,61	35,95	39,01
	50	45,78	33,73	37,94	40,38
	75	47,18	35,06	39,22	41,68

Dabei zeigen sich folgende Verteilungen (Abb. 8 bis 11):

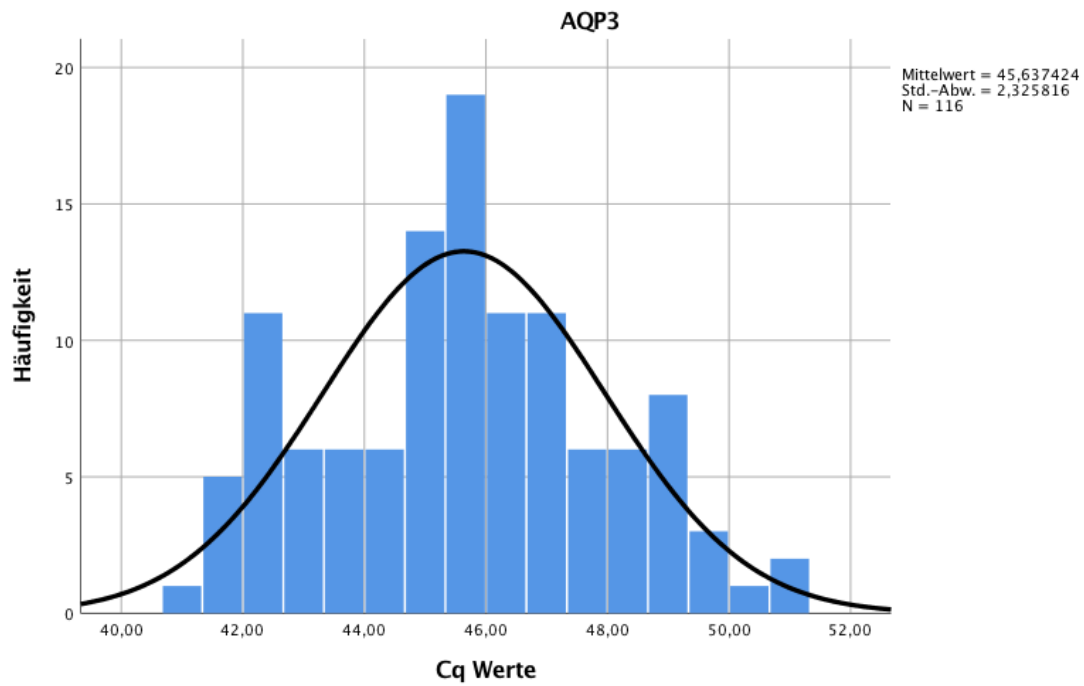


Abb. 8: Verteilung der ΔCq Werte der AQP3-mRNA-Expression.

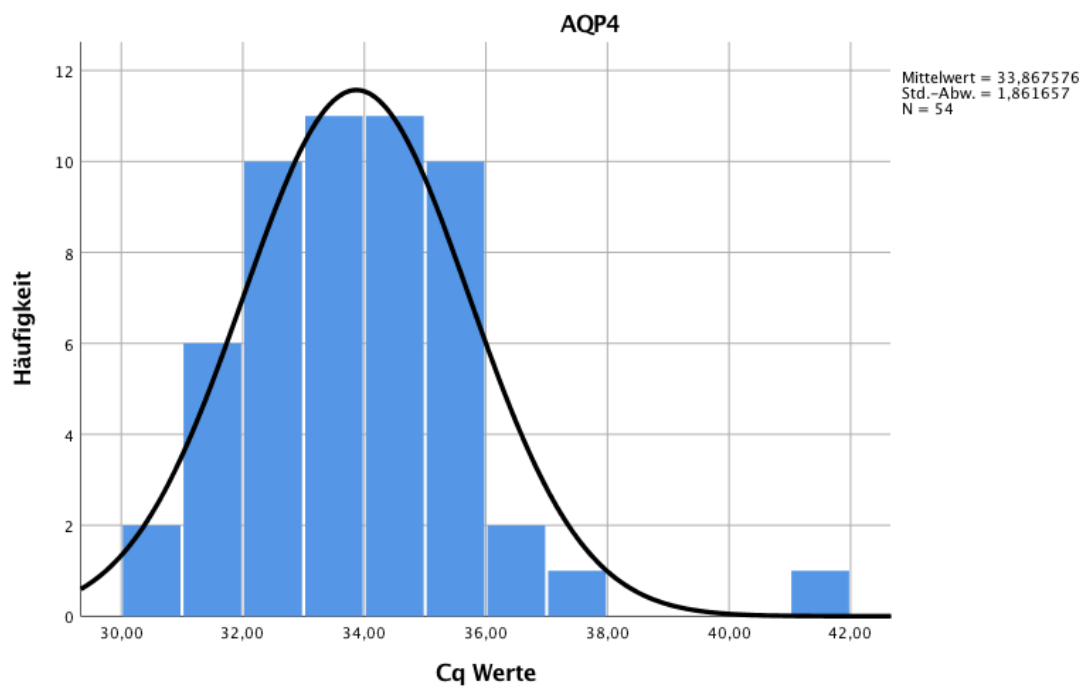


Abb. 9: Verteilung der ΔCq Werte der AQP4-mRNA-Expression.

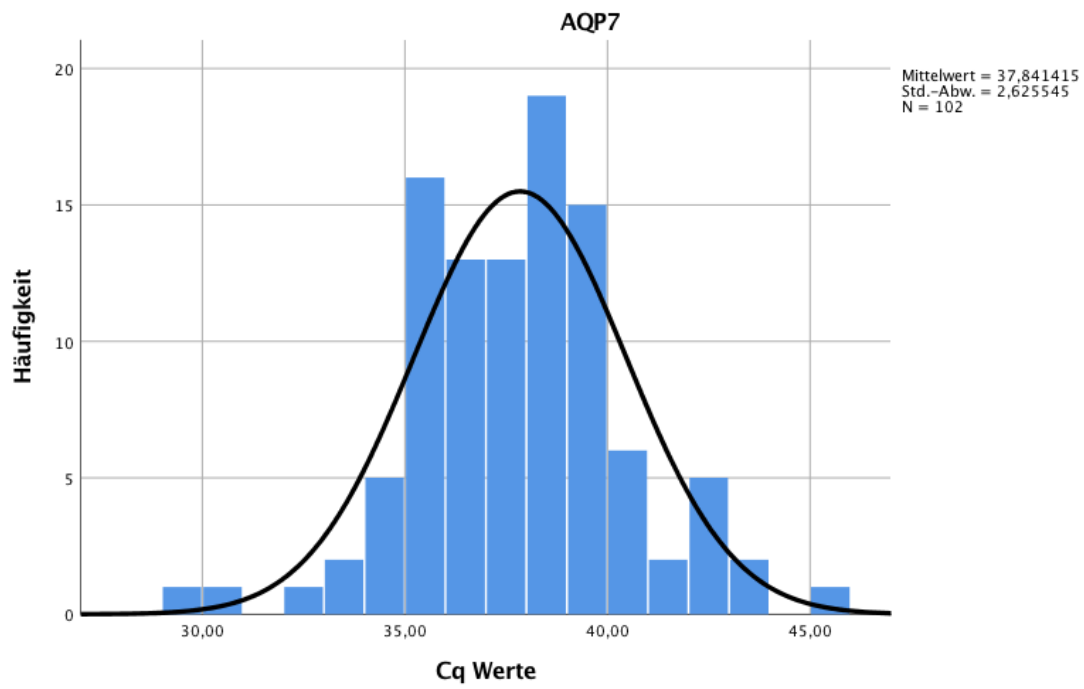


Abb. 10: Verteilung der ΔCq Werte der AQP-7-mRNA-Expression.

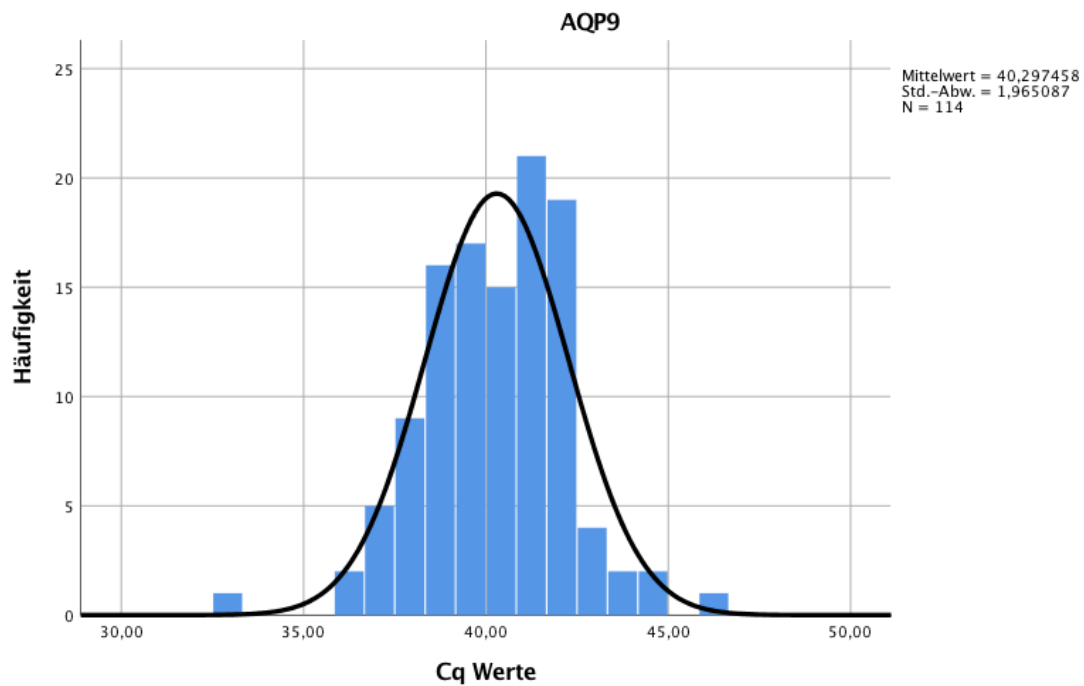


Abb. 11: Verteilung der ΔCq Werte der AQP9-mRNA-Expression.

Folgende Tabelle zeigt den Anteil der Patienten (n) mit nachgewiesener mRNA-Expression unterschiedlicher Aquaporine an der Gesamtkohorte, der Patienten mit G3 Tumoren, mit multifokalen Tumoren oder mit konkomittantem Cis. Zusätzlich ist der Anteil der tumorbedingten Tode, sowie das Auftreten von Rezidiven und Progressionen in diesen Gruppen aufgeführt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anzahl der Ereignisse bei Patienten der Gesamtkohorte, mit G3 Tumoren, mit multifokalen Tumoren und mit konkomittantem Cis in Bezug auf die Aquaporinexpression.

Aquaporin	Kohorte	n	Rezidiv	Progression	Tod tumorbedingt
Aquaporin 3	Gesamtkohorte	116 (99,1%)	40 (34,5%)	18 (15,5%)	15 (12,9%)
	G3 Tumore	82 (98,8%)	26 (31,7%)	13 (15,9%)	10 (12,2%)
	Multifokale Tumore	70 (98,6%)	31 (44,3%)	16 (22,9%)	14 (20,0%)
	Konkomittantes Cis	47 (97,9%)	20 (42,6%)	11 (23,4%)	7 (14,9%)
Aquaporin 4	Gesamtkohorte	54 (46,1%)	24 (44,4%)	12 (22,2%)	10 (18,5%)
	G3 Tumore	34 (41,0%)	13 (38,2%)	7 (20,6%)	5 (14,7%)
	Multifokale Tumore	36 (50,7%)	19 (52,8%)	11 (30,6%)	10 (27,8%)
	Konkomittantes Cis	19 (89,6%)	11 (57,9%)	6 (31,6%)	4 (21,1%)
Aquaporin 7	Gesamtkohorte	102 (87,2%)	35 (34,3%)	16 (15,7%)	13 (12,7%)
	G3 Tumore	74 (89,2%)	23 (31,1%)	12 (16,2%)	9 (12,2%)
	Multifokale Tumore	64 (90,1%)	28 (43,8%)	14 (21,9%)	12 (18,8%)
	Konkomittantes Cis	43 (89,6%)	20 (46,5%)	11 (25,6%)	7 (16,3%)
Aquaporin 9	Gesamtkohorte	114 (97,4%)	40 (35,1%)	18 (15,8%)	15 (13,2%)
	G3 Tumore	81 (97,6%)	26 (32,1%)	13 (16,0%)	10 (12,3%)
	Multifokale Tumore	68 (95,8%)	31 (45,6%)	16 (23,5%)	14 (20,6%)
	Konkomittantes Cis	47 (97,9%)	20 (42,6%)	11 (23,4%)	7 (14,9%)

In der Gesamtkohorte verteilten sich die Ereignisse bei Tumoren mit AQP3, AQP7 und AQP9-Expression annähernd gleich, während die Proben, welchen eine AQP4-Expression gemessen werden konnte, höhere Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeiten, sowie tumorbedingte Tode aufwiesen.

Patienten mit AQP3-Expression im Tumorgewebe zeigten in multifokalen Tumoren die höchste Rezidivwahrscheinlichkeit (44,3%). Ebenso verhielt es sich bei AQP9-Expression (45,6%). AQP4 und AQP7-Expression ging bei Patienten mit konkomittantem Cis mit der höchsten Rezidivwahrscheinlichkeit einher (AQP4 57,9%/ AQP7 46,5%). Die höchsten Progressionswahrscheinlichkeiten wiesen Patienten mit konkomittantem Cis auf. Lediglich bei AQP9-Expression zeigten

multifokale Tumore annähernd gleich hohe Werte. Die höchste Wahrscheinlichkeit eines tumorbedingten Todes ergab sich unabhängig von der AQP-Expression bei multifokalen Tumoren (Tabelle 11).

3.1.3 Korrelation der Aquaporin-mRNA-Expression mit klinischen und pathologischen Parametern

Um einen Zusammenhang zwischen den im Tumorgewebe exprimierten Aquaporinen und unterschiedlichen klinischen und pathologischen Parametern zu untersuchen, wurde die Rangkorrelation nach Spearman verwendet.

Tabelle und Abb. 12 zeigen die signifikanten Korrelationen. AQP3-mRNA-Expression korreliert signifikant mit niedrigerem Grading nach WHO1973 ($p=0,005$) und der Abwesenheit von konkomittantem Cis ($p=0,006$), zeigt jedoch eine positive Korrelation mit der TumorgroÙe ($p=0,043$).

Im Gegensatz zu AQP3 korreliert AQP7-mRNA-Expression mit höherem Grading nach WHO1973 ($p=0,041$). AQP9-mRNA-Expression zeigt eine positive Korrelation mit dem Alter ($p=0,027$), konkomittantem Cis ($p=0,003$), Fokalität ($p=0,020$) und dem EORTC Progression Score ($p=0,028$).

Darüber hinaus zeigt sich eine positive Korrelation zwischen AQP4 und AQP7 ($p=0,032$).

Tabelle 12: Korrelation der Aquaporin-mRNA-Expression mit klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.

Variable	Kovariable	Spearman`s Rho	p-Wert
AQP3	Grading WHO1973	-0,260	0,005
	konkomittantes Cis	-0,254	0,006
	TumorgroÙe	0,188	0,043
AQP4	AQP7	0,295	0,032
AQP7	Grading WHO1973	0,203	0,041
	AQP4	0,295	0,032
AQP9	Alter	0,207	0,027
	konkomittantes Cis	0,280	0,003
	Fokalität	0,218	0,020
	EORTC Progression Risk Score	0,206	0,028

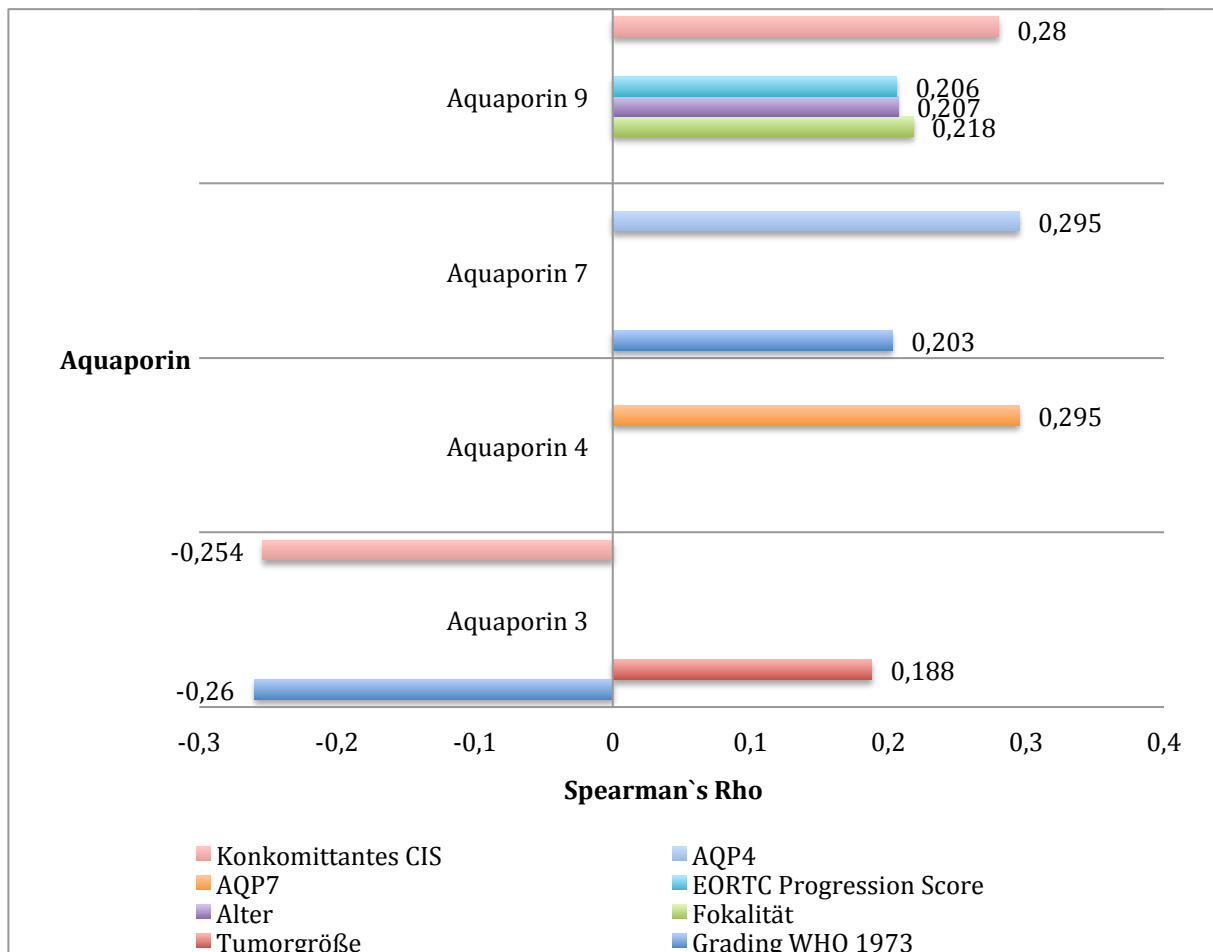


Abb. 12: Balkendiagramm zur Darstellung des Ausmaßes der Korrelation zwischen der mRNA-Expression von AQP3, 4, 7 und 9 und klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.

3.1.4 Korrelation der Aquaporine untereinander

Auch zwischen den im Tumorgewebe exprimierten Aquaporinen wurde die Rangkorrelation nach Spearman erhoben.

Dabei zeigt sich lediglich zwischen AQP4 und AQP7 eine signifikante Korrelation ($p=0,032$) (Tabelle 13).

Tabelle 13: Korrelationen zwischen AQP3, AQP4, AQP7 und AQP9.

		AQP3	AQP4	AQP7	AQP9
AQP3	Korrelationskoeffizient	1,000	0,241	-0,078	-0,077
	Signifikanz	.	0,080	0,434	0,420
	N	116	54	102	113
AQP4	Korrelationskoeffizient	0,241	1,000	0,295	-0,017
	Signifikanz	0,080	.	0,032	0,905
	N	54	54	53	54
AQP7	Korrelationskoeffizient	-0,078	0,295	1,000	0,013
	Signifikanz	0,434	0,032	.	0,893
	N	102	53	102	101
AQP9	Korrelationskoeffizient	-0,077	-0,017	0,013	1,000
	Signifikanz	0,420	0,905	0,893	.
	N	113	54	101	114

3.1.5 Kaplan - Meier - Überlebenszeitanalyse

Zur Überlebenszeitanalyse wurde das Kaplan-Meier-Verfahren benutzt. Dabei wurde der Einfluss der Aquaporin-mRNA-Expression in den Tumorproben auf das rezidivfreie, progressionsfreie und tumorspezifische Überleben der Patienten im Follow-up verglichen.

3.1.5.1 Überlebenszeitanalyse unterschiedlicher Aquaporinexpressionen

Im Folgenden ist die Verteilung der ΔCq Werte der Aquaporinmessungen der RFS-, PFS- und CSS-Dauer gegenübergestellt. Im Mittel zeigten die Patienten ein rezidivfreies Überleben von 28,98 Monaten. Das mittlere progressionsfreie Überleben lag bei 34,04 Monaten und das karzinomspezifische Überleben bei 36,62 Monaten.

Tabelle 14: Dauer des RFS, PFS, CSS und die ΔCq Werte der Aquaporine im Vergleich.

		RFS	PFS	CSS	AQP3	AQP4	AQP7	AQP9
		Dauer	Dauer	Dauer				
N	Gültig	117	117	117	116	54	102	114
	Fehlend	0	0	0	1	63	15	3
Mittelwert		28,98	34,04	36,62	45,64	33,87	37,84	40,30
Median		22,00	29,00	31,00	45,78	33,73	37,94	40,38
Minimum		1	1	1	41,02	30,40	29,30	32,95
Maximum		109	109	109	51,06	41,33	45,38	46,01
Perzentile	25	11,00	14,00	19,00	43,98	32,61	35,95	39,01
	50	22,00	29,00	31,00	45,78	33,73	37,94	40,38
	75	38,50	47,50	50,00	47,18	35,06	39,22	41,68

3.1.5.1.1 Korrelation der AQP3-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 117 Patienten konnte bei 116 Patienten eine AQP3-mRNA-Expression gemessen werden (99,1%). Diese Expressionen wurden auf 4 Quartile zu je 29 Patienten mit in Tabelle 14 aufgeführten ΔCq Werten verteilt.

3.1.5.1.1.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von den 116 Patienten mit AQP3-mRNA-Expression entwickelten 40 Patienten ein Rezidiv (34,5%).

Dabei kam es bei 8 Patienten in Q1 (27,6%), bei 12 Patienten in Q2 (41,4%), bei 10 Patienten in Q3 (34,5%) und bei 10 Patienten in Q4 (34,5%) zu einem Rezidiv. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP3-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,783$).

3.1.5.1.1.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von den 116 Patienten mit AQP3-mRNA-Expression entwickelten 18 Patienten im Verlauf einen Progress zum MIBC (15,5%).

Davon zeigten 4 Patienten ΔCq Werte in Q1 (13,8%), 5 Patienten in Q2 (17,2%), 6 Patienten in Q3 (20,7%) und 3 Patienten in Q4 (10,3%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP3-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,796$).

3.1.5.1.1.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 116 Patienten mit AQP3-mRNA-Expression verstarben 15 Patienten tumorbedingt (12,9%). Davon zeigten je 3 Patienten (10,3%) Δ Cq Werte der ersten, zweiten und vierten Quartile. In der dritten Quartile waren es 6 (20,7%). Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP3-mRNA-Expression und dem CSS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,746$).

3.1.5.1.2 Korrelation der AQP4-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 117 Patienten konnte bei 54 Patienten eine AQP4-mRNA-Expression gemessen werden (46,2%). Diese Expressionen wurden auf 4 Quartile mit in Tabelle 14 aufgeführten Δ Cq Werten, zu je 13 Patienten in Q1 und Q4 und zu je 14 Patienten in Q2 und Q3, verteilt.

3.1.5.1.2.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von den 54 Patienten mit AQP4-mRNA-Expression entwickelten 24 ein Rezidiv (44,4%).

Von den Patienten mit Δ Cq Werten in Q1 entwickelten 7 ein Rezidiv (53,8%). In Q2 waren es ebenfalls 7 Patienten (50,0%), in Q3 entwickelten 5 ein Rezidiv (35,7%) und in Q4 ebenfalls 5 (38,5%).

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP4-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,831$).

3.1.5.1.2.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

12 der 54 Patienten mit AQP4-mRNA-Expression entwickelten einen Progress zum MIBC (22,2%).

In Q1 und Q4 entwickelten jeweils 3 Patienten eine Progression (23,1%). In Q2 waren es 4 Patienten (28,6%) und in Q3 2 (14,3%).

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP4-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,858$).

3.1.5.1.2.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 54 Patienten mit AQP4-mRNA-Expression verstarben 2 Patienten (15,4%) mit Δ Cq Werten in Q1 tumorbedingt. In Q2 verstarben 4 (28,6%). In Q3 verstarb 1 (7,1%) und in Q4 3 (23,1%).

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP4-mRNA-Expression und dem CSS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,467$).

3.1.5.1.3 Korrelation der AQP7-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 117 Patienten konnte bei 102 Patienten eine AQP7-mRNA-Expression gemessen werden (87,2 %). Diese Expressionen wurden auf 4 Quartile mit in Tabelle 14 aufgeführten ΔCq Werten zu je 25 Patienten in Q1 und Q4 und zu je 26 Patienten in Q2 und Q3 verteilt.

3.1.5.1.3.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von 102 Patienten mit AQP7-mRNA-Expression kam es bei 35 Patienten zu einem Rezidiv (34,3%). Von den Patienten mit ΔCq Werten in Q1 entwickelten 9 ein Rezidiv (36,0%). In Q2 waren es 7 Patienten (26,9%), in Q3 12 Patienten (46,2%) und in Q4 7 (28,0%).

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP7-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,527$).

3.1.5.1.3.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von 102 Patienten mit AQP7-mRNA-Expression kam es bei 16 Patienten zu einer Progression (15,7%). Von den Patienten mit ΔCq Werten in Q1 entwickelten 2 eine Progression (8,0%), in Q2 waren es 3 Patienten (11,5%), in Q3 8 Patienten (30,8%) und in Q4 3 (12,0%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP7-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,106$).

3.1.5.1.3.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von 102 Patienten mit AQP7-mRNA-Expression verstarben 2 Patienten (8,0%) mit ΔCq Werten in Q1, in Q2 1 Patient (3,8%), in Q3 7 Patienten (26,9%) und in Q4 3 (12,0%). Dabei zeigten Patienten mit AQP7-mRNA-Expression in Q1/2 ein signifikant besseres tumorspezifisches Überleben als Patienten mit Werten in Q3/4 ($p=0,042$) (Abb. 13).

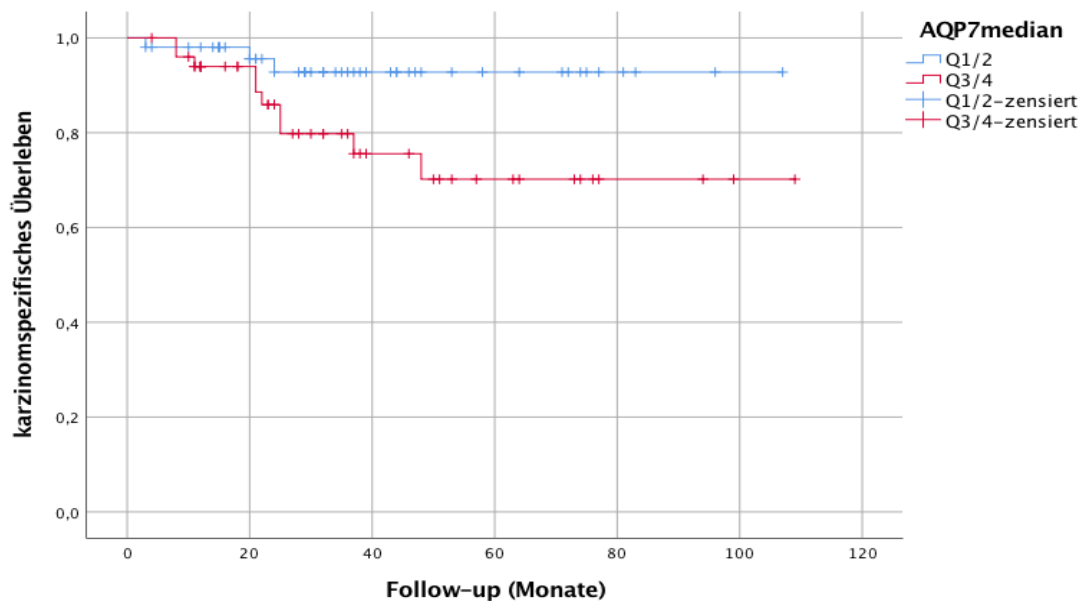


Abb. 13: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der AQP7 mRNA-Expression auf das CSS in der Gesamtkohorte, (cut-off: Median; $p=0,042$).

3.1.5.1.4 Korrelation der AQP9-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 117 Patienten konnte bei 114 eine AQP9-mRNA-Expression gemessen werden (97,4%).

Diese Expressionen wurden auf 4 Quartile zu je 28 Patienten mit ΔCq Werten in Q1 und Q4 und zu je 29 Patienten in Q2 und Q3 verteilt.

3.1.5.1.4.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von 114 Patienten mit AQP9-mRNA-Expression kam es bei 40 Patienten zu einem Rezidiv (35,1%). Von den Patienten mit ΔCq Werten in Q1 entwickelten 13 ein Rezidiv (46,4%). In Q2 waren es 6 (20,7%), 13 Patienten in Q3 (44,8%) und 8 in Q4 (28,6%).

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP9-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,094$).

3.1.5.1.4.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von 114 Patienten mit AQP9-mRNA-Expression kam es bei 18 Patienten zu einer Progression (15,8%). In Q1 kam es bei 2 Patienten zu einer Progression (7,1%), in Q2 bei 4 (13,8%), in Q3 bei 7 Patienten (24,1%) und in Q4 bei 5 (17,9%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP9-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,426$).

3.1.5.1.4.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von 114 Patienten mit AQP9-mRNA-Expression verstarb 1 Patient mit mRNA-Expression in Q1 (3,6%), in Q2 und Q3 jeweils 5 Patienten (17,2%) und 4 mit Werten in Q4 (14,3%) tumorbedingt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP9-mRNA-Expression und dem CSS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,493$).

3.1.5.2 Überlebenszeitanalyse klinischer und pathologischer Parameter

Neben der Überlebenszeitanalyse der Patienten in Bezug auf die Aquaporinexpression, wurde der Einfluss der erhobenen klinischen und pathologischen Parameter auf das RFS, PFS und CSS untersucht (Tabelle 15).

Dabei zeigte die Fokalität der Tumore, die Wahl der Therapie (Blasenerhalt vs. sekundäre Zystektomie vs. Frühzystektomie) und die Unterscheidung zwischen low- und high-grade Tumoren einen signifikanten Einfluss aufs Überleben.

Konkomittantes Cis, die Tumorgröße und Grading nach WHO 1973 zeigten keinen signifikanten Zusammenhang.

Tabelle 15: Korrelation zwischen der Fokalität des Tumors, der Art der Therapie, Grading nach WHO 2004/2016 und RFS, PFS und CSS.

Parameter	Signifikanz (p-Wert)		
	RFS	PFS	CSS
Fokalität multifokal vs. unifokal	0,018	0,010	0,009
Therapie (Blasenerhalt vs. sekundäre Zystektomie vs. Frühzystektomie)	<0,001	<0,001	<0,001
Grading WHO 2004/2016 high-grade vs. low-grade	0,030	0,357	0,323

3.1.5.2.1 Einfluss der Fokalität auf das Überleben

Von den 117 verwertbaren Tumorproben wiesen 71 (60,7%) multifokale Tumore und 46 (39,3%) unifokale Tumore auf. Die Überlebenszeitanalyse der Tumorproben unterschiedlicher Fokalität zeigte signifikante Unterschiede. Multifokalität ging dabei sowohl mit schlechterem rezidiv- und progressionsfreiem Überleben, als auch mit schlechterem Karzinomspezifischen Überleben einher.

3.1.5.2.1.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von den 46 Patienten mit unifokalem Tumor entwickelten 9 (19,6%) ein Rezidiv. Bei den 71 Patienten mit multifokalem Tumor waren es 31 (43,7%).

Dabei zeigten die multifokalen Tumore ein signifikant schlechteres RFS als unifokale Tumore ($p=0,018$) (Tabelle 15/ Abb. 14).

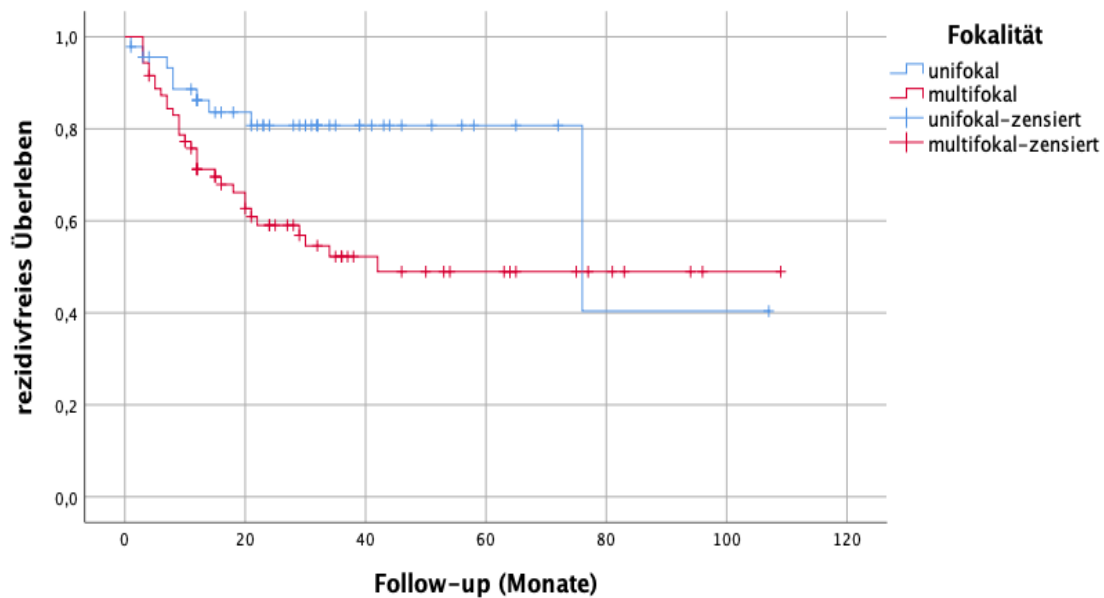


Abb. 14: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Fokalität auf das RFS ($p=0,018$).

3.1.5.2.1.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von den 46 Patienten mit unifokalem Tumor entwickelten 2 (4,3%) einen Progress. Bei den 71 Patienten mit multifokalem Tumor waren es 16 (22,5%).

Dabei zeigten multifokale Tumore ein signifikant schlechteres PFS als unifokale Tumore ($p=0,010$) (Tabelle 15/ Abb. 15).

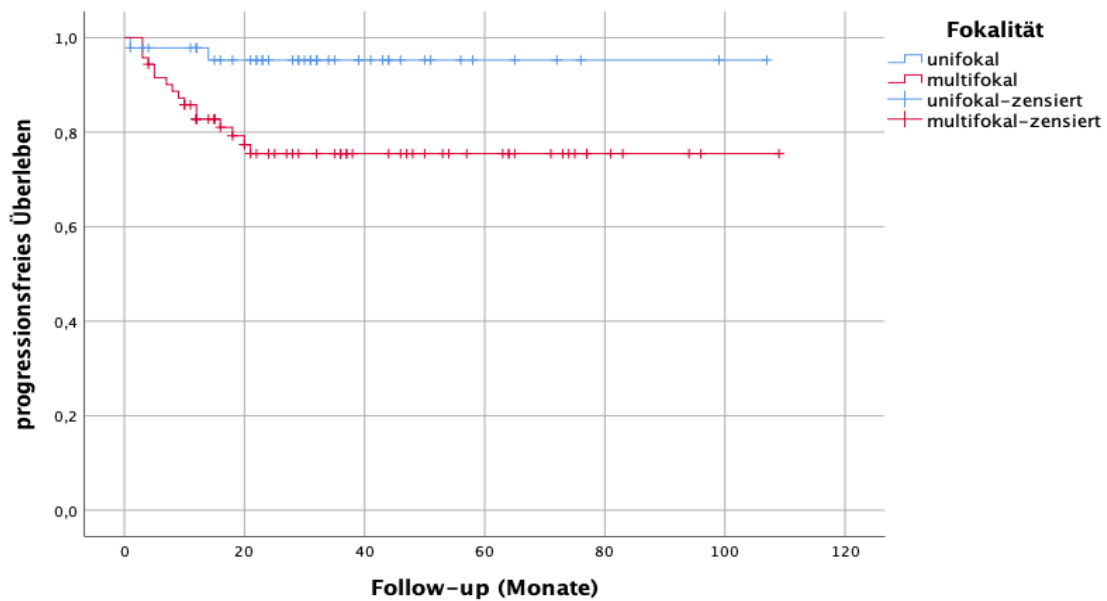


Abb. 15: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Fokalität auf das PFS ($p=0,010$).

3.1.5.2.1.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 46 Patienten mit unifokalem Tumor verstarb 1 (2,2%) tumorbedingt. Bei den 71 Patienten mit multifokalem Tumor waren es 14 (19,7%).

Dabei zeigten die multifokalen Tumore ein signifikant schlechteres CSS als unifokale Tumore ($p=0,009$) (Tabelle 15/ Abb. 16).

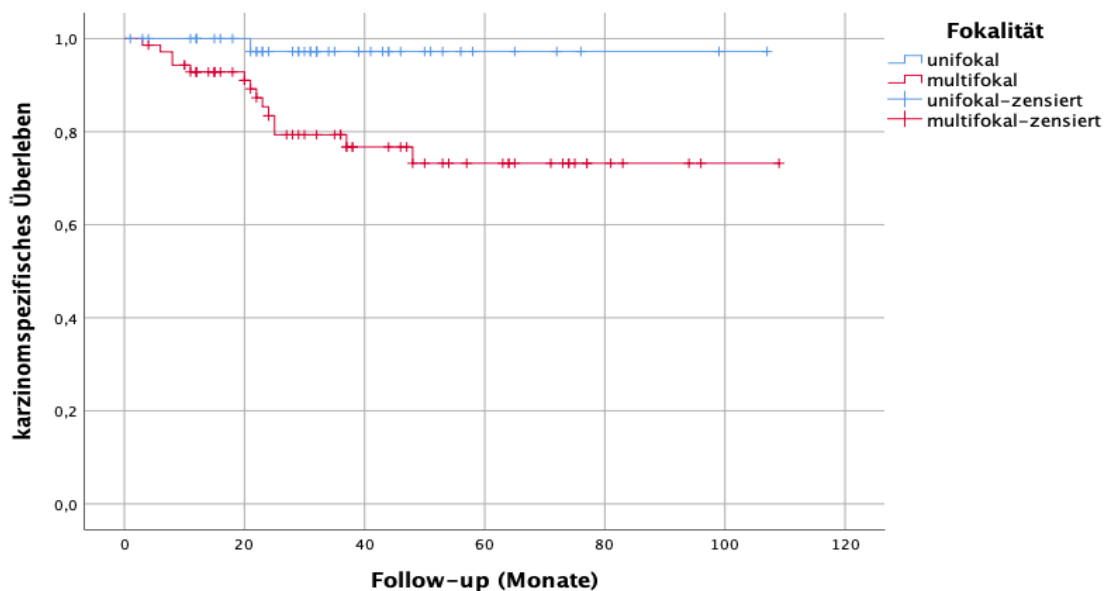


Abb. 16: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Fokalität auf das CSS ($p=0,009$).

3.1.5.2.2 Einfluss des Blasenerhalts und des Zeitpunkts der Zystektomie auf das Überleben

Von 117 Patienten erhielten 13 (11%) eine Frühzystektomie. 11 (9,4%) erhielten eine sekundäre Zystektomie bei Nachweis eines MIBC und 93 (79,5%) wurden blasenerhaltend therapiert.

Die Überlebenszeitanalyse der Patienten mit unterschiedlichen Therapieansätzen zeigte signifikante Unterschiede.

3.1.5.2.2.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Bei 4 der 13 Frühzystektomierten (30,8%), bei allen 11 sekundär zystektomierten (100%) und bei 25 der 93 blasenerhaltend therapierten (26,9%) kam es zu einem Rezidiv. Die sekundär zystektomierten zeigten dabei ein signifikant schlechteres RFS, als die Frühzystektomierten und die blasenerhaltend therapierten ($p < 0,001$) (Tabelle 15/ Abb. 17).

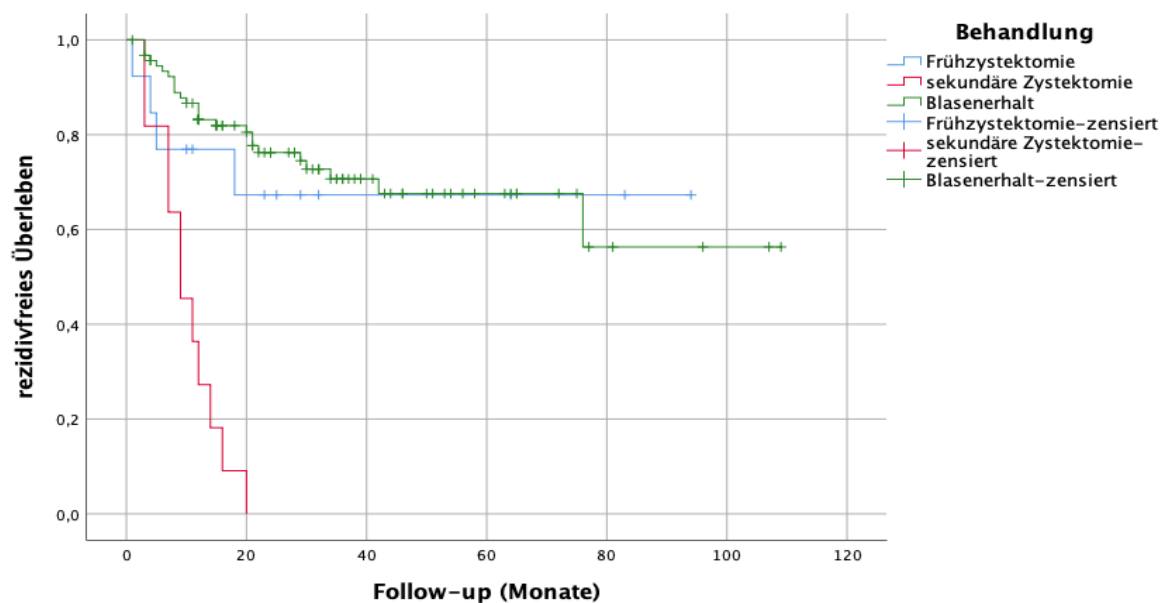


Abb. 17: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Therapie auf das RFS ($p < 0,001$).

3.1.5.2.2.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Bei 4 frühzystektomierten (30,8%), 8 sekundär zystektomierten (72,7%) und 6 blasenerhaltend therapierten (6,5%) kam es zu einer Progression. Die sekundär zystektomierten zeigten dabei ein signifikant schlechteres PFS, als die frühzystektomierten und die blasenerhaltend therapierten ($p < 0,001$) (Tabelle 15/ Abb. 18).

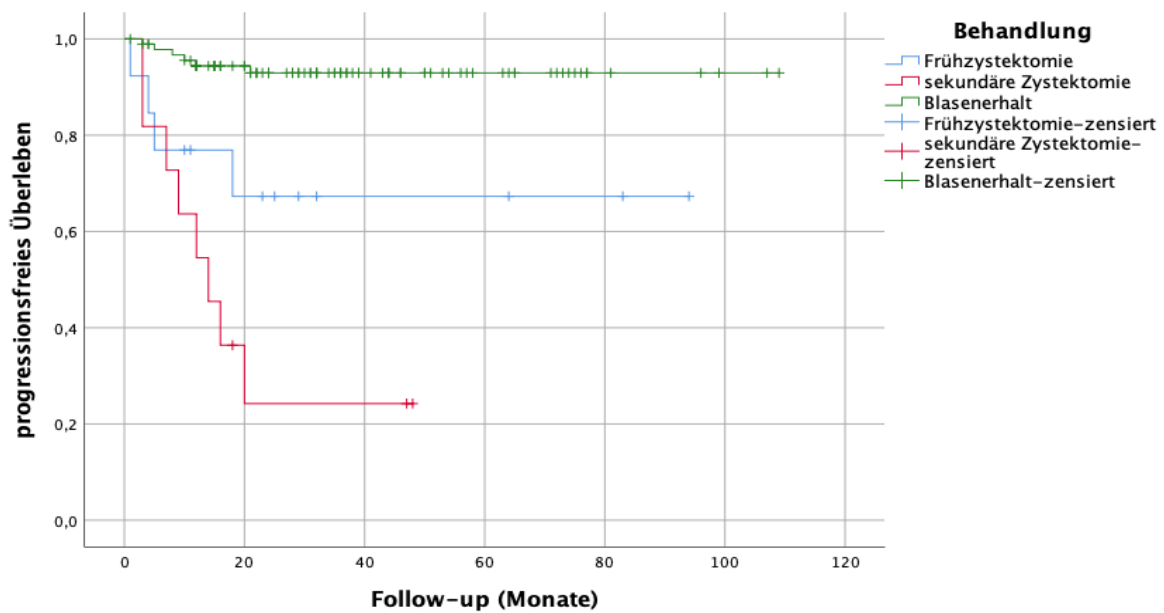


Abb. 18: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Therapie auf das PFS ($p < 0,001$).

3.1.5.2.2.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 13 Patienten, die eine Frühzystektomie erhielten, verstarben 3 (23,1%) tumorbedingt. Von den 11 sekundär zystektomierten starben 6 (54,5%) und von den 93 blasenerhaltend therapierten ebenfalls 6 (6,4%) tumorbedingt. Patienten, die eine sekundäre Zystektomie erhielten, zeigten dabei ein signifikant schlechteres tumorbedingtes Überleben, als die frühzystektomierten und die Patienten, die blasenerhaltend therapiert werden konnten ($p < 0,001$) (Tabelle 15/ Abb. 19).

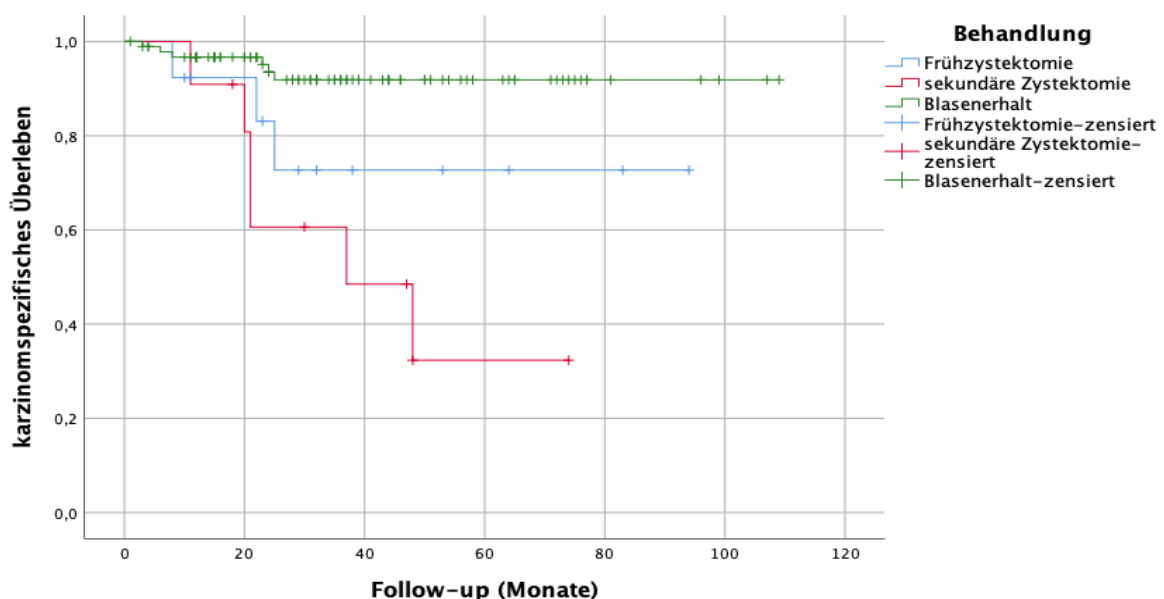


Abb. 19: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Therapie auf das CSS ($p < 0,001$).

3.1.5.2.3 Einfluss des Gradings nach WHO2004/2016 auf das Überleben

Von 117 Patienten konnte im Follow-up bei 109 Patienten das Grading von 2004/2016 erhoben werden. Bei 8 Patienten fehlte die Angabe im pathologischen Befund. Dabei konnten 7 (6,4%) den low-grade und 102 (93,6%) den high-grade Tumoren zugeordnet werden.

3.1.5.2.3.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von den 7 Patienten mit low-grade Tumoren entwickelten 5 ein Rezidiv (71,4%). Von den 102 Patienten mit high-grade Tumoren entwickelten 35 ein Rezidiv (34,3%). Dabei kam es bei low-grade Tumoren signifikant häufiger zu einem Rezidiv ($p=0,030$) (Tabelle 15/ Abb. 20).

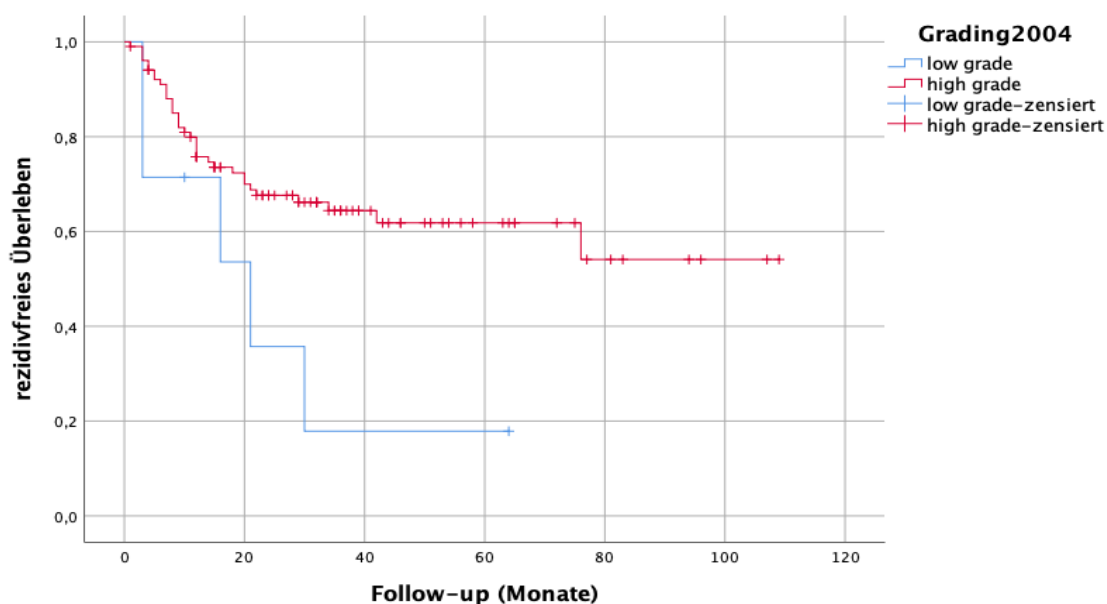


Abb. 20: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses des Gradings nach WHO2004/2016 auf das RFS ($p=0,030$).

3.1.5.2.3.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von den 7 Patienten mit low-grade Tumor entwickelten 2 (28,6%) eine Progression. Bei den 102 Patienten mit high-grade Tumor waren es 16 (15,7%).

Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug aufs karzinomspezifische Überleben ($p=0,357$) (Tabelle 15).

3.1.5.2.3.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 7 Patienten mit low-grade Tumor verstarben 2 (28,6%) tumorbedingt. Bei den 102 Patienten mit high-grade Tumor waren es 13 (12,7%).

Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug aufs karzinomspezifische Überleben ($p=0,323$) (Tabelle 15).

3.1.6 Unterteilung der Gesamtkohorte anhand klinischer und pathologischer Parameter

Im Folgenden wurde der Einfluss der AQP-mRNA-Expression auf das Überleben in folgenden Hochrisikogruppen untersucht: G3 Tumoren, T1 Tumoren mit konkomittantem Cis, Tumoren größer/gleich 3 cm und multifokalen Tumoren (Tabelle 16).

Tabelle 16: Korrelationen zwischen der anhand klinischer und pathologischer Parameter unterteilten Gesamtkohorte und unterschiedlicher Aquaporinexpressionen in Bezug aufs RFS, PFS und CSS.

Variable	Überleben	Aquaporinexpression	p-Wert
Patienten mit G3 Tumoren nach WHO1973	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS	AQP9 Q1/2 besser	0,029
	CSS	AQP7 Q1/2 besser	0,036
Patienten mit multifokalem Tumor	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS		Keine signifikanten Werte
	CSS		Keine signifikanten Werte
Patienten mit konkomittantem Cis	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS		Keine signifikanten Werte
	CSS		Keine signifikanten Werte
Patienten mit Tumoren größer/gleich 3cm	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS		Keine signifikanten Werte
	CSS		Keine signifikanten Werte

3.1.6.1 Patienten mit einem G3 Tumor nach WHO1973

Von 117 Patienten wiesen 83 einen G3 Tumor (70,9%) und 34 einen G2 Tumor (29,1%) auf. 15 Patienten verstarben tumorbedingt. Von den 83 Patienten mit G3, verstarben 10 tumorbedingt (12,0%). Bei den 34 Patienten mit G2 verstarben 5 tumorbedingt (14,7%).

Die Patienten mit G3 Tumor nach Grading WHO1973 werden im Folgenden in Bezug auf die AQP3,4,7,9-mRNA-Expression näher betrachtet, um einen potenziellen Einfluss der AQP-mRNA-Expression auf die Tumordifferenzierung zu untersuchen.

3.1.6.1.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine gab es bei Patienten mit G3 Tumoren in Bezug auf das RFS keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16).

3.1.6.1.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

AQP9

Bei 81 der 83 Patienten mit G3 Tumor konnte AQP9-mRNA gemessen werden (97,6%). Dabei kam es bei 13 Patienten, bei welchen eine AQP9-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, zu einer Progression (16%).

Eine AQP9-mRNA-Expression mit ΔCq Werten in Q1/2 zeigte dabei ein signifikant besseres PFS als in Q3/4 ($p=0,029$) (Tabelle 16/ Abb. 21). Von 37 Patienten in Q1/2 entwickelten 2 einen Progress (5,4%). Von 44 Patienten in Q3/4 entwickelten 11 einen Progress (25%). Hinsichtlich der mRNA-Expression der übrigen gemessenen Aquaporine zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

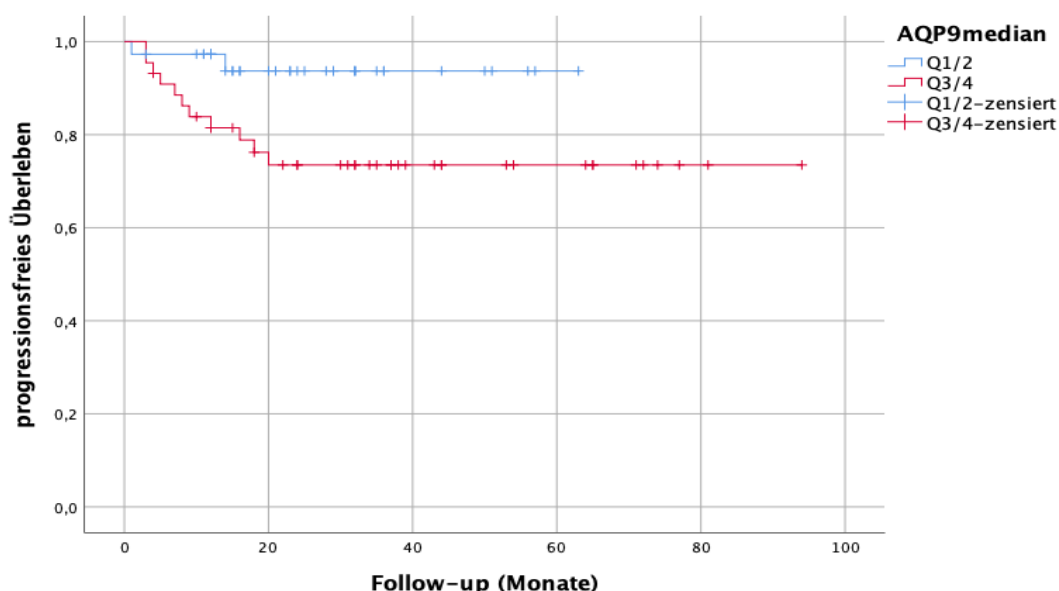


Abb. 21: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit G3 Tumor und der Auswirkung der AQP9-mRNA-Expression auf das PFS (cut-off: Median; $p=0,029$).

3.1.6.1.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

AQP7

Bei 74 Tumorproben der 83 Patienten mit G3 Tumoren konnte AQP7-mRNA nachgewiesen werden (89,2%). Dabei verstarben 9 Patienten, bei welchen eine AQP7-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, tumorbedingt (12,2%).

Eine AQP7-mRNA-Expression mit ΔCq Werten in Q1/2 zeigte dabei ein signifikant besseres CSS als in Q3/4 ($p=0,036$) (Tabelle 16/ Abb. 22). Von 34 Patienten in Q1/2 verstarb 1 tumorbedingt (2,9%). Von 40 Patienten in Q3/4 verstarben 8 tumorbedingt (20%).

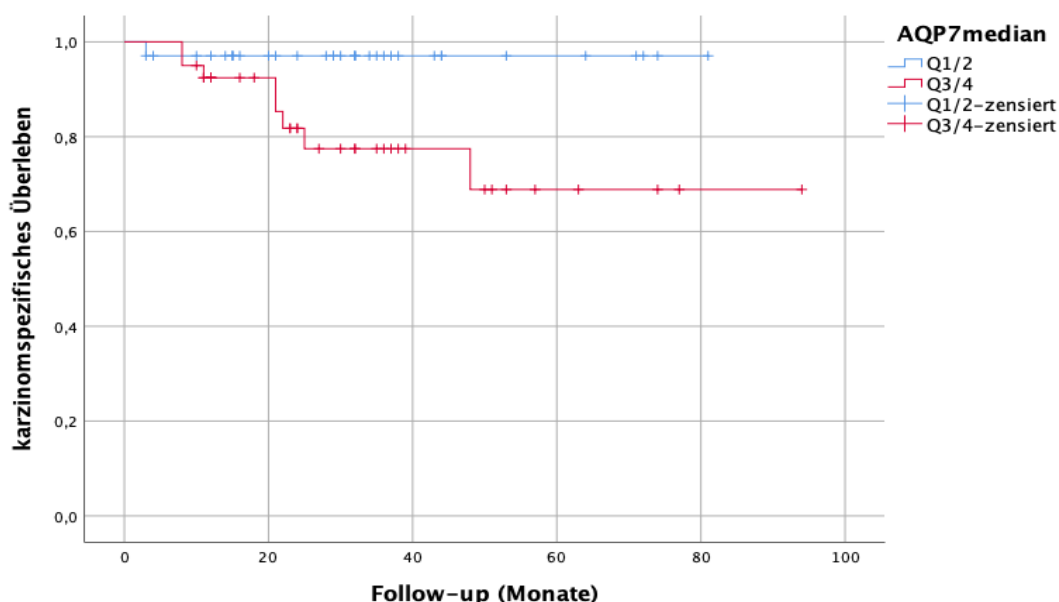


Abb. 22: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit G3 Tumor und der Auswirkung der AQP7-mRNA-Expression auf das CSS (cut-off: Median; $p=0,036$).

3.1.6.2 Patienten mit multifokalem Tumor

Von 117 Patienten mit NMIBC wiesen 46 Patienten (39,3%) einen unifokalen und 71 (60,7%) einen multifokalen Tumor auf. Von diesen verstarben jeweils 1 (2,2%) bzw. 14 (12,0%) tumorbedingt. Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine gab es bei Patienten mit multifokalen Tumoren in Bezug auf das RFS, PFS und CSS keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16).

3.1.6.3 Patienten mit konkomittantem Cis

Von 117 Patienten mit NMIBC wiesen 48 Patienten (41,0%) ein konkomittantes Cis auf. Von diesen verstarben 7 (14,6%) tumorbedingt.

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine in Bezug aufs RFS, PFS und CSS bei Patienten mit konkomittantem Cis gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16).

3.1.6.4 Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm

Von 117 Patienten mit NMIBC wiesen 61 Patienten (52,1%) einen Tumor größer/gleich als 3 cm auf. Von diesen verstarben 11 (18,0%) tumorbedingt.

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine in Bezug aufs RFS, PFS und CSS bei Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16).

3.2 Kohorte ohne Frühzystektomien

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der Aquaporin-Expression in NMIBC auf die Prognose der Patienten mit diesen Tumoren zu untersuchen. Damit sollte ein prognostischer Parameter getestet werden, der als Entscheidungshilfe bei möglichen Frühzystektomien herangezogen werden könnte. Um aufzuzeigen, welche dieser Patienten von einer Frühzystektomie profitiert hätten, wurde das Patientenkollektiv auch unter Ausschluss der bereits primär frühzystektomierten Patienten analysiert. Darüber hinaus konnte dadurch ein etwaiger Bias aufgrund der unterschiedlichen Therapie- und Nachsorgeschemata für Patienten mit Frühzystektomie und sekundärer Zystektomie und eine damit einhergehende Verzerrung des Follow-up, vermieden werden.

3.2.1 Patientenkollektiv

Von 117 Patienten erhielten 13 eine Frühzystektomie (11,1%), 11 eine sekundäre Zystektomie (9,4%) und 93 wurden blasenerhaltend therapiert (79,5%). Im Folgenden wird die Gesamtkohorte ohne Patienten mit Frühzystektomie betrachtet (N=104).

Im Follow-up wurde bei 36 Patienten ein Rezidiv entdeckt (34,6%). Bei 14 Patienten kam es zur Progression (13,5%).

Dabei verstarben 12 Patienten tumorbedingt (11,5%). Weitere 15 Patienten verstarben nicht tumorbedingt (14,4%) und 77 lebten am Ende des Follow-up (74,0%) (Tabelle 17).

Tabelle 17: Deskriptive Statistik der Kohorte ohne Frühzystektomien.

	Parameter		Häufigkeit	Prozent
Merkmal	Geschlecht	männlich	89	85,6%
		weiblich	15	14,4%
	Alter	<75	64	61,5%
		≥75	40	38,5%
	Raucher	aktiv	28	26,9%
		nie	22	21,2%
		ex	38	36,5%
unbekannt		16	15,4%	
Diagnostik	PDD	nein	30	28,8%
		ja	74	71,2%
Befund	Erstbefund		104	100%
	Zweitumor	Zweitumor	24	23,1
		kein Zweitumor	80	76,9%
Pathologische Parameter	Staging	pT1	104	100%
	Grading WHO1973	G2	33	31,7%
		G3	71	68,3%
	Grading WHO2016	low-grade	6	5,8%
		high-grade	90	86,5%
		fehlend	8	7,7%
	konkomittantes Cis	nein	62	59,6%
		ja	42	40,4%
	Fokalität	multifokal	61	58,7%
		unifokal	43	41,3%
Tumorgröße	<3cm	50	48,1%	
	≥3cm	54	51,9%	
Klinische Parameter	EORTC Recurrence Risk Score	low	1	0,9%
		intermediate	89	85,6%
		high	14	13,5%
	EORTC Progression Risk Score	intermediate	5	4,8%
		high	99	95,2%
Therapie	Einfüllungen	keine	21	20,2%

	Instillationstherapie	Instillation erfolgt	83	79,8%
		MMC	20	19,2%
		BCG	63	60,6%
		Keine	21	20,2%
	Behandlung	sekundäre Zystektomie	11	10,6%
		Blasenerhalt	93	89,4%
Überleben	RFS	Rezidiv	36	34,6%
		kein Rezidiv	68	65,4%
	PFS	Progress	14	13,5%
		kein Progress	90	86,5%
	CSS	lebt	77	74,0%
		Tod tumorbedingt	12	11,5%
		Tod nicht tumorbedingt	15	14,4%

3.2.2 AQP-Expression in der T1 NMIBC Kohorte ohne Frühzystektomie

Von diesen 104 Proben konnte bei 103 (99,0%) AQP3, bei 48 (46,2%) AQP4, bei 89 (85,6%) AQP7 und bei 101 (97,1%) AQP9 in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Bei den fehlenden Proben konnte keine oder eine zu geringe mRNA Menge nachgewiesen werden.

Folgende ΔC_q Werte wurden ermittelt (Tabelle 18):

Tabelle 18: Errechnete ΔC_q Werte der mRNA Messungen der Aquaporine 3,4,7 und 9.

		AQP3	AQP4	AQP7	AQP9
	Gültig	103	48	89	101
	Fehlend	1	56	15	3
Mittelwert		45,61	33,93	37,70	40,25
Median		45,81	33,76	37,74	40,39
Minimum		41,02	30,40	29,30	32,95
Maximum		50,88	41,33	45,38	46,01
Perzentile	25	43,97	32,63	35,80	39,00
	50	45,81	33,76	37,74	40,39
	75	47,22	35,08	39,17	41,70

Dabei zeigen sich folgende Verteilungen (Abb. 23 bis 26):

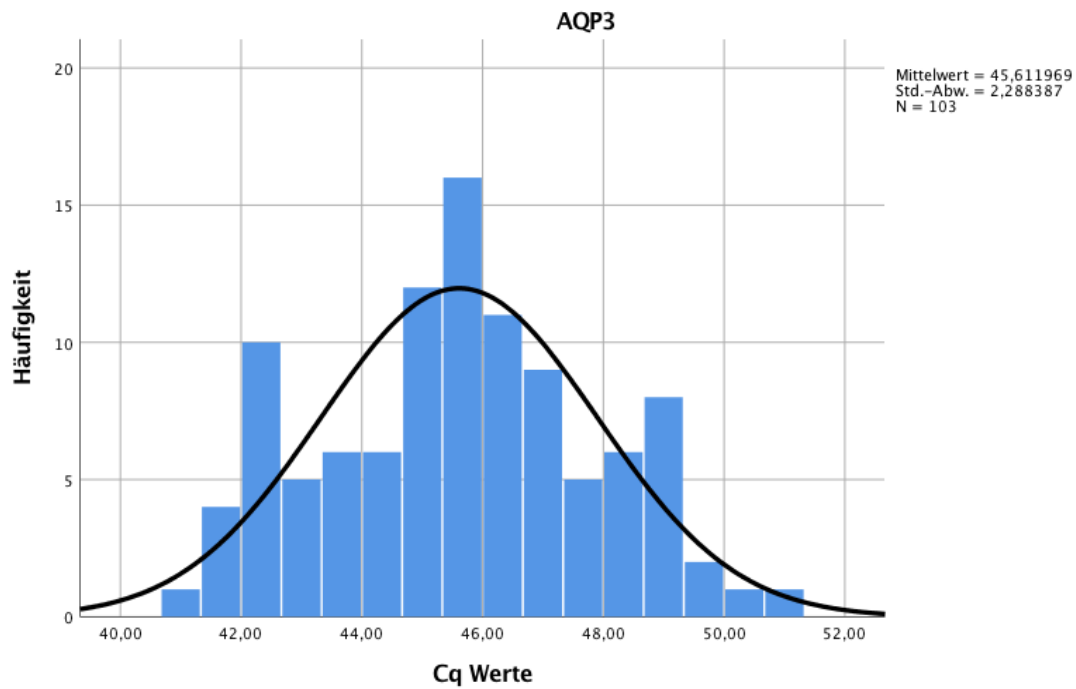


Abb. 23: Verteilung der ΔCq Werte der AQP3-mRNA-Expression.

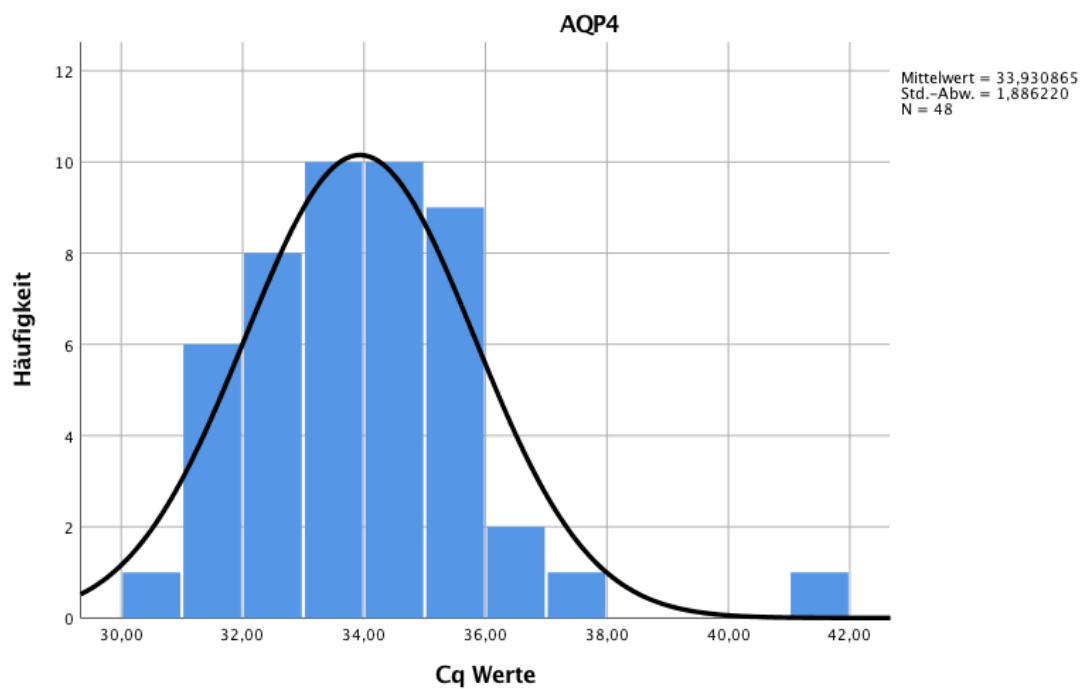


Abb. 24: Verteilung der ΔCq Werte der AQP4-mRNA-Expression.

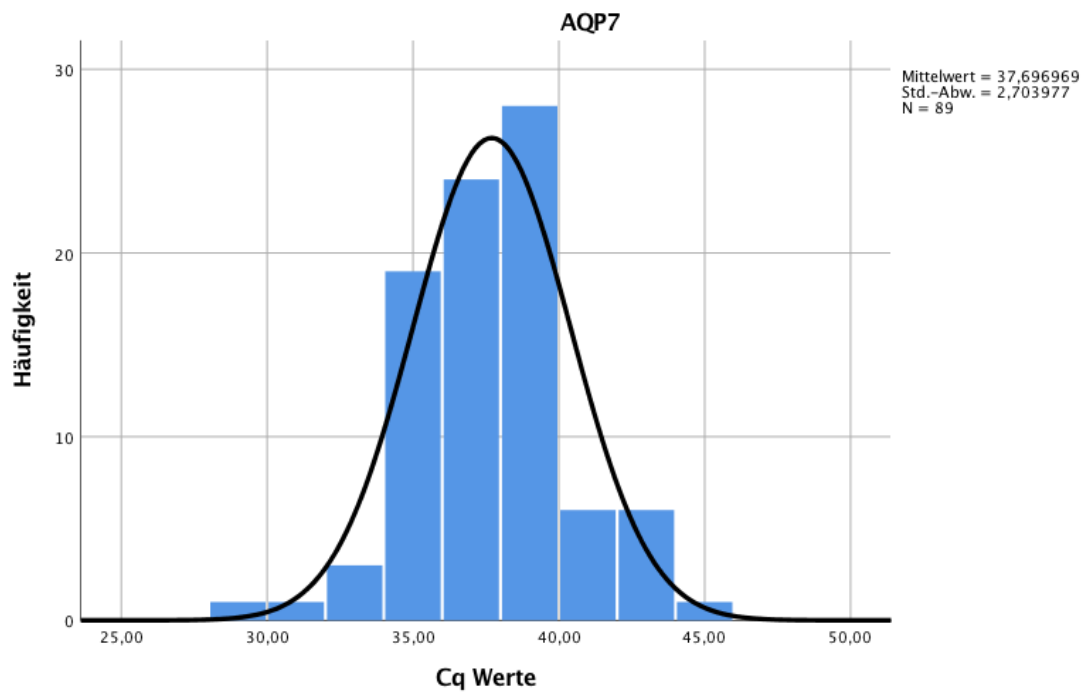


Abb. 25: Verteilung der Δ Cq Werte der AQP7-mRNA-Expression.

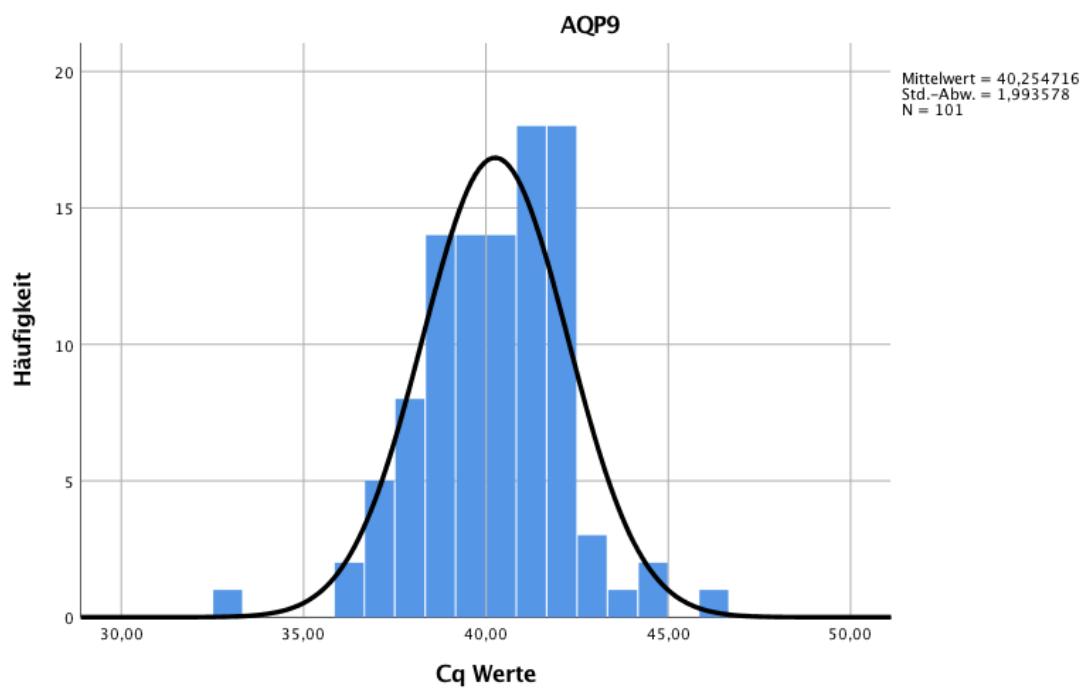


Abb. 26: Verteilung der Δ Cq Werte der AQP9-mRNA-Expression.

3.2.3 Korrelation der Aquaporin-mRNA-Expression mit klinischen und pathologischen Parametern

Tabelle 19 und Abb. 27 zeigen Korrelationen zwischen den Aquaporinen und klinischen und pathologischen Parametern. AQP3-mRNA-Expression ging mit geringerem Grading WHO1973 (-0,254/ p=0,010) und weniger konkomittanten Cis (-0,248/ p=0,011) einher. AQP9-mRNA-Expression im Tumorgewebe korrelierte mit vermehrter Multifokalität (0,223/ p=0,025) und konkomittanten Cis (0,272/ p=0,006), höherem Alter (0,211/ p=0,034) und höherem EORTC Progression Score (0,216/ p=0,030). AQP4 und AQP7 korrelierten miteinander (0,340/ p=0,019).

Tabelle 19: Korrelation der Aquaporin-mRNA-Expression mit klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.

Variable	Kovariable	Spearman`s Rho	p-Wert
AQP3	Grading WHO1973	-0,254	0,010
	konkomittantes Cis	-0,248	0,011
AQP4	AQP7	0,340	0,019
AQP7	AQP4	0,340	0,019
AQP9	Alter	0,211	0,034
	konkomittantes Cis	0,272	0,006
	Fokalität	0,223	0,025
	EORTC Progression Risk Score	0,216	0,030

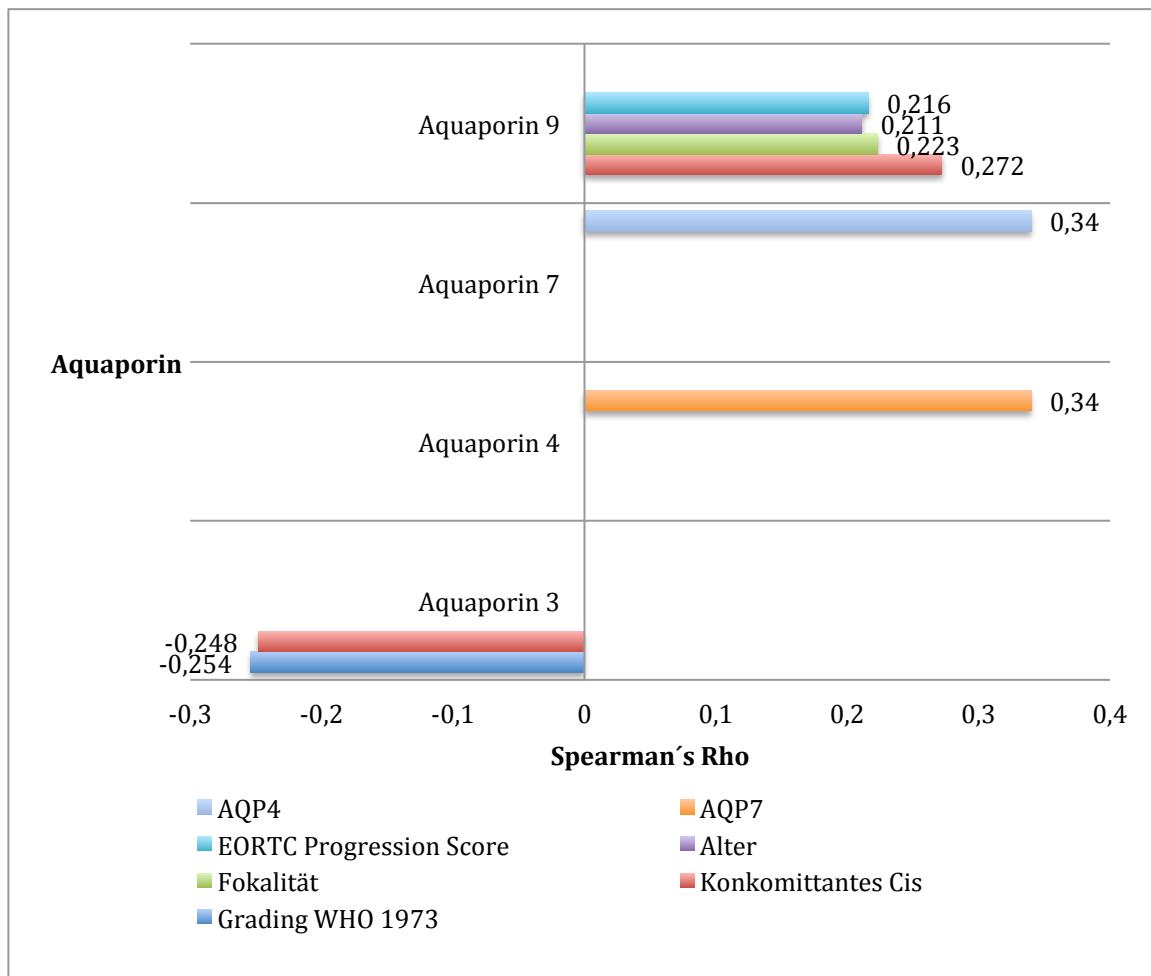


Abb. 27: Balkendiagramm zum Ausmaß der Korrelation zwischen den Aquaporinen und klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.

3.2.4 Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse der Kohorte ohne Frühzystektomie

Entsprechend der Gesamtkohorte wurde der Einfluss der Aquaporin-mRNA-Expression in den Tumorproben auf das rezidivfreie, progressionsfreie und tumorspezifische Überleben der Patienten im Follow-up untersucht.

Tabelle 20 vergleicht die Verteilung der ΔCq Werte der Aquaporinmessungen. Demgegenüber ist die Dauer des RFS, PFS und CSS dargestellt. Im Mittel zeigten die Patienten ein rezidivfreies Überleben von 28,77 Monaten. Das mittlere progressionsfreie Überleben lag bei 34,46 Monaten und das karzinomspezifische Überleben bei 36,46 Monaten.

Tabelle 20: Dauer des RFS, PFS, CSS und die ΔCq Werte der Aquaporin Quartilen im Vergleich.

		RFS	PFS	CSS	AQP3	AQP4	AQP7	AQP9
		Dauer	Dauer	Dauer				
N	Gültig	104	104	104	103	48	89	101
	Fehlend	0	0	0	1	56	15	3
Mittelwert		28,77	34,46	36,46	45,61	33,93	37,70	40,25
Median		22,00	29,50	31,50	45,81	33,76	37,74	40,39
Minimum		1	1	1	41,02	30,40	29,30	32,95
Maximum		109	109	109	50,88	41,33	45,38	46,01
Perzentile	25	12,00	15,00	18,50	43,97	32,63	35,80	39,00
	50	22,00	29,50	31,50	45,81	33,76	37,74	40,39
	75	38,75	47,75	49,50	47,22	35,08	39,17	41,70

Wie in der Gesamtkohorte zeigten sich bei der Kohorte ohne Frühzystektomien keine signifikanten Korrelationen zwischen den ΔCq Werten der Aquaporin-mRNA-Expression und RFS, PFS und CSS.

3.2.4.1 Überlebenszeitanalyse unterschiedlicher Aquaporinexpressionen

3.2.4.1.1 Korrelation der AQP3-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 104 Patienten konnte bei 103 Patienten eine AQP3-mRNA-Expression gemessen werden (99,0%). Diese Expressionen wurden auf 4 Quartile zu je 26 Patienten in den Quartilen 2 bis 4 und 25 Patienten in der Quartile 1 mit in Tabelle 20 aufgeführten ΔCq Werten verteilt.

3.2.4.1.1.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von den 103 Patienten mit AQP3-mRNA-Expression entwickelten 36 Patienten ein Rezidiv (35,0%).

Dabei kam es bei 5 Patienten in Q1 (20,0%), bei 11 Patienten in Q2 (42,3%), bei 10 Patienten in Q3 (38,5%) und bei 10 Patienten in Q4 (38,5%) zu einem Rezidiv. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP3-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,430$).

3.2.4.1.1.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von den 103 Patienten mit AQP3-mRNA-Expression entwickelten 14 Patienten im Verlauf einen Progress zum MIBC (13,6%).

Davon zeigte 1 Patient ΔCq Werte in Q1 (4,0%), 4 Patienten in Q2 (15,4%), 6 Patienten in Q3 (42,9%) und 3 Patienten in Q4 (23,1%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP3-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,310$).

3.2.4.1.1.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 103 Patienten mit AQP3-mRNA-Expression verstarben 12 Patienten tumorbedingt (11,7%). Davon zeigte 1 Patient (4,0%) ΔCq Werte der ersten, 2 Patienten (7,7%) der zweiten, 6 Patienten (23,1%) der dritten und drei Patienten (11,5%) der vierten Quartile. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP3-mRNA-Expression und dem CSS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,276$).

3.2.4.1.2 Korrelation der AQP4-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 104 Patienten konnte bei 48 Patienten eine AQP4-mRNA-Expression gemessen werden (46,6 %). Diese Expressionen wurden auf 4 Quartilen mit in Tabelle 20 aufgeführten ΔCq Werten, zu je 12 Patienten verteilt.

3.2.4.1.2.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von den 48 Patienten mit AQP4-mRNA-Expression entwickelten 21 ein Rezidiv (43,8%).

Von den Patienten mit ΔCq Werten in Q1 und Q4 entwickelten jeweils 5 ein Rezidiv (41,7%). In Q2 waren es 7 Patienten (58,3%) und in Q3 4 (33,3%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP4-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,783$).

3.2.4.1.2.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

9 der 48 Patienten mit AQP4-mRNA-Expression entwickelten einen Progress zum MIBC (18,8%).

In Q2 und Q4 entwickelten jeweils 3 Patienten eine Progression (25,0%). In Q1 war es 1 Patient (8,3%) und in Q3 2 (16,7%). Es konnte kein signifikanter Unterschied

zwischen der AQP4-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,657$).

3.2.4.1.2.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 48 Patienten mit AQP4-mRNA-Expression verstarb jeweils 1 Patient (8,3%) mit ΔCq Werten in Q1 und Q3 tumorbedingt. In Q2 und Q4 verstarben jeweils 3 (25,0%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP4-mRNA-Expression und dem CSS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,503$).

3.2.4.1.3 Korrelation der AQP7-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 104 Patienten konnte bei 89 Patienten eine AQP7-mRNA-Expression gemessen werden (86,4%). Diese Expressionen wurden auf 4 Quartilen mit in Tabelle 20 aufgeführten ΔCq Werten zu je 22 Patienten in Q1, Q3 und Q4 und zu 23 Patienten in Q2 verteilt.

3.2.4.1.3.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von 89 Patienten mit AQP7-mRNA-Expression kam es bei 31 Patienten zu einem Rezidiv (34,8%). Von den Patienten mit ΔCq Werten in Q1 entwickelten 9 ein Rezidiv (40,9%). In Q2 waren es 5 Patienten (21,7%), in Q3 10 Patienten (45,5%) und in Q4 7 (31,8%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP7-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,498$).

3.2.4.1.3.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von 89 Patienten mit AQP7-mRNA-Expression kam es bei 12 Patienten zu einer Progression (13,5%). Von den Patienten mit ΔCq Werten in Q1 entwickelten 2 eine Progression (9,1%), in Q2 war es 1 Patient (4,3%), in Q3 6 Patienten (27,3%) und in Q4 3 (13,6%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP7-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,138$).

3.2.4.1.3.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von 89 Patienten mit AQP7-mRNA-Expression verstarben 2 Patienten (9,1%) mit ΔCq Werten in Q1, in Q2 1 Patient (4,3%), in Q3 4 Patienten (18,2%) und in Q4 3 (13,6%) tumorbedingt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP7-mRNA-Expression und dem CSS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,601$).

3.2.4.1.4 Korrelation der AQP9-mRNA-Expression mit dem Überleben

Von den insgesamt 104 Patienten konnte bei 101 eine AQP9-mRNA-Expression gemessen werden (98,1 %).

Diese Expressionen wurden auf 4 Quartilen zu je 25 Patienten mit ΔCq Werten in Q1, Q2 und Q4 und zu 26 Patienten in Q3 verteilt.

3.2.4.1.4.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von 101 Patienten mit AQP9-mRNA-Expression kam es bei 36 Patienten zu einem Rezidiv (35,6%). Von den Patienten mit ΔCq Werten in Q1 entwickelten 12 ein Rezidiv (48,0%). In Q2 waren es 6 (24,0%), 11 Patienten in Q3 (42,3%) und 7 in Q4 (28,0%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP9-mRNA-Expression und dem RFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,150$).

3.2.4.1.4.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von 101 Patienten mit AQP9-mRNA-Expression kam es bei 14 Patienten zu einer Progression (13,9%). In Q1 kam es bei 1 Patienten zu einer Progression (4,0%), in Q2 bei 4 (16,0%), in Q3 bei 5 Patienten (19,2%) und in Q4 bei 4 (16,0%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP9-mRNA-Expression und dem PFS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,476$).

3.2.4.1.4.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von 101 Patienten mit AQP9-mRNA-Expression verstarb tumorbedingt 1 Patient mit mRNA- Expression in Q1 (4,0%), in Q2 und Q4 jeweils 4 Patienten (16,0%) und 3 mit Werten in Q3 (11,5%). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AQP9-mRNA-Expression und dem CSS festgestellt werden (cut-off: Median; $p=0,583$).

3.2.4.2 Überlebenszeitanalyse klinischer und pathologischer Parameter

Neben der Überlebenszeitanalyse der Patienten in Bezug auf die exprimierten Aquaporine, wurden die erhobenen klinischen und pathologischen Parameter untersucht (Tabelle 21).

Dabei zeigte die Fokalität der Tumore einen signifikanten Einfluss auf RFS, PFS und CSS. Die Unterscheidung zwischen low- und high-grade Tumoren wirkte sich signifikant auf das RFS aus.

Konkomittantes Cis, die Tumorgroße, die Art der Instillationstherapie und das Grading nach WHO 1973 zeigte keinen signifikanten Zusammenhang.

Tabelle 21: Korrelation zwischen der Fokalität des Tumors, Grading WHO 2004/2016 und RFS, PFS und CSS.

Parameter	Signifikanz (p-Wert)		
	RFS	PFS	CSS
Grading WHO 2004/2016: high-grade vs. low-grade	0,015	0,196	0,241
Fokalität: multifokal vs. unifokal	0,010	0,006	0,021

3.2.4.2.1 Einfluss des Gradings nach WHO2004/2016 auf das Überleben

Von 104 Patienten konnte bei 96 Patienten das Grading von 2004 erhoben werden. Bei 8 Patienten fehlte die Angabe im pathologischen Befund. Dabei konnten 6 (5,8%) den low-grade und 90 (86,5%) den high-grade Tumoren zugeordnet werden.

3.2.4.2.1.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von den 6 Patienten mit low-grade Tumoren entwickelten 5 ein Rezidiv (83,3%). Von den 90 Patienten mit high-grade Tumoren entwickelten 31 ein Rezidiv (34,4%). Dabei kam es bei low-grade Tumoren signifikant häufiger zu einem Rezidiv ($p=0,015$) (Tabelle 21/ Abb. 28).

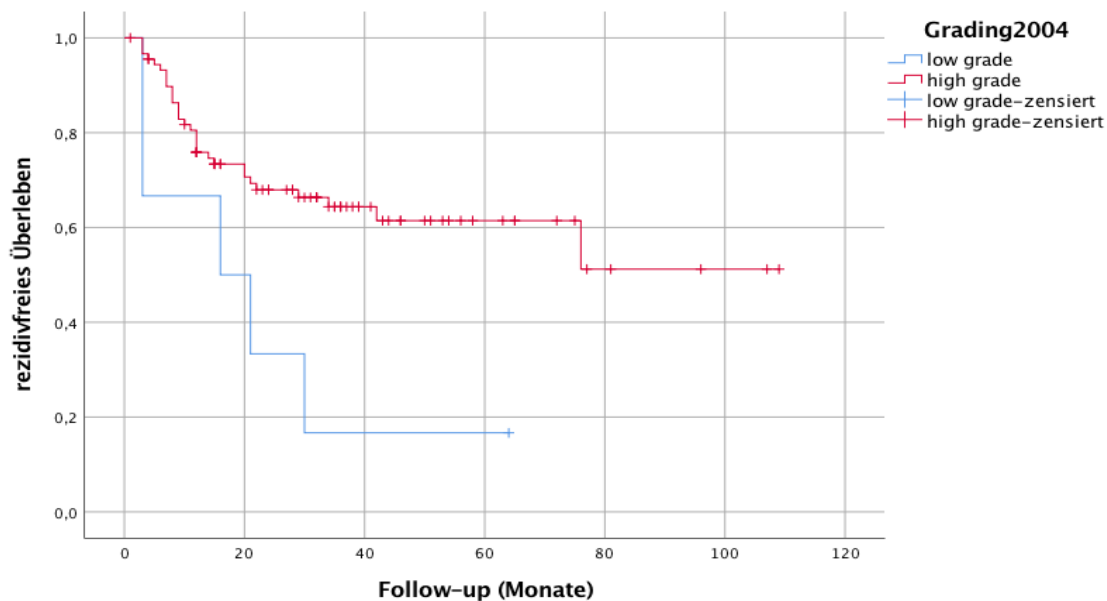


Abb. 28: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung des Gradings nach WHO2004/2016 auf das RFS ($p=0,015$).

3.2.4.2.1.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine gab es bei Patienten mit high-grade Tumoren in Bezug auf das PFS keine signifikanten Unterschiede zu Patienten mit low-grade Tumoren ($p=0,196$) (Tabelle 21).

3.2.4.2.1.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine gab es bei Patienten mit high-grade Tumoren in Bezug auf das CSS keine signifikanten Unterschiede zu Patienten mit low-grade Tumoren ($p=0,241$) (Tabelle 21).

3.2.4.2.2 Einfluss der Fokalität auf das Überleben

Von 104 Patienten, die keine Frühzystektomie erhalten hatten, wiesen 43 (41,3%) einen unifokalen Tumor und 61 (58,7%) einen multifokalen Tumor auf.

3.2.4.2.2.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Von 43 Patienten mit unifokalem Tumor erlitten 8 ein Rezidiv (18,6%). Bei den 61 Patienten mit multifokalem Tumor erlitten 28 ein Rezidiv (45,9%).

Dabei zeigt sich ein signifikant besseres RFS bei Patienten mit unifokalem Tumor ($p=0,010$) (Tabelle 21/ Abb.29).

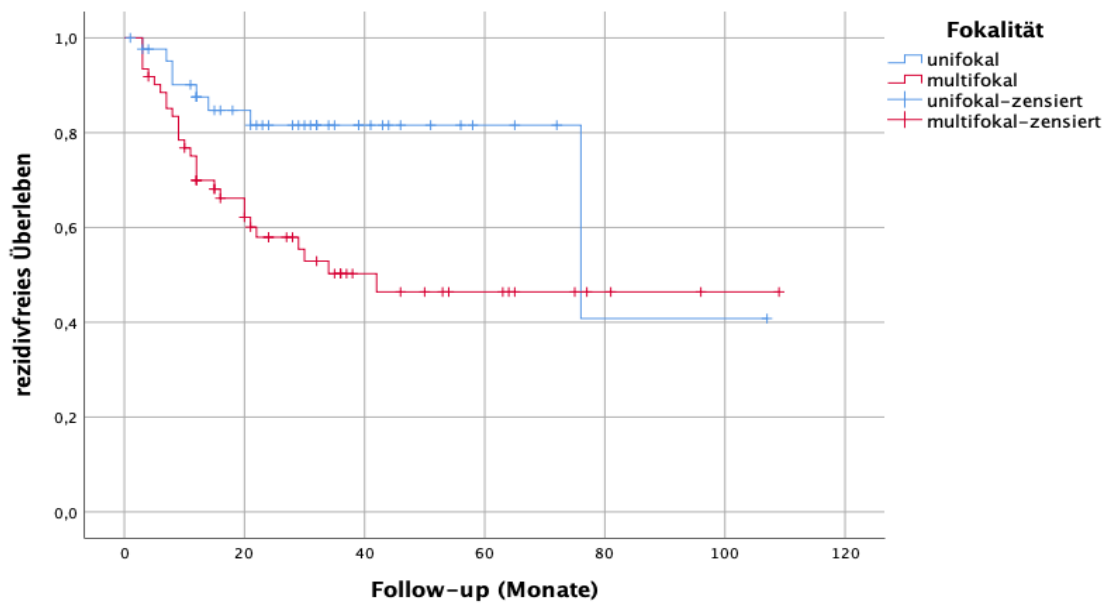


Abb. 29: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung der Fokalität auf das RFS ($p=0,010$).

3.2.4.2.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Von den 43 Patienten mit unifokalen Tumoren erlitt 1 Patient einen Progress (2,3%). Bei den 61 Patienten mit multifokalen Tumoren kam es bei 13 zu einer Progression (21,3%). Dabei gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Fokalität und PFS ($p=0,006$) (Tabelle 21/ Abb.30).

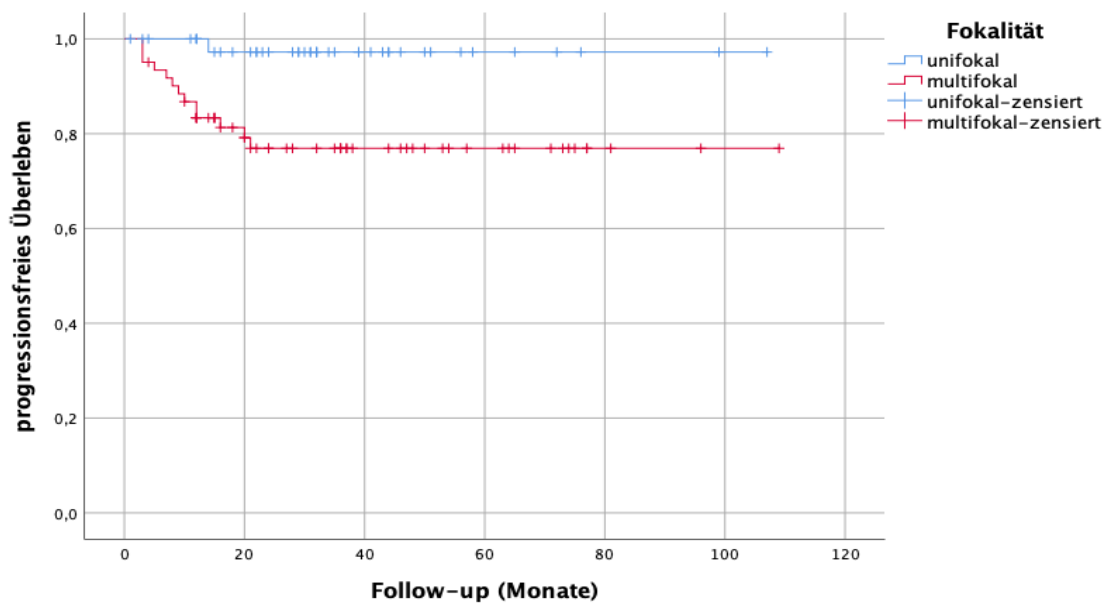


Abb. 30: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung der Fokalität auf das PFS ($p=0,006$).

3.2.4.2.2.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 43 Patienten mit unifokalem Tumor verstarb 1 (2,3%) tumorbedingt. Von den 61 Patienten mit multifokalem Tumor waren es 11 (18%). Multifokale Tumore zeigten dabei ein signifikant schlechteres CSS als unifokale ($p=0,021$) (Tabelle 21/ Abb.31).

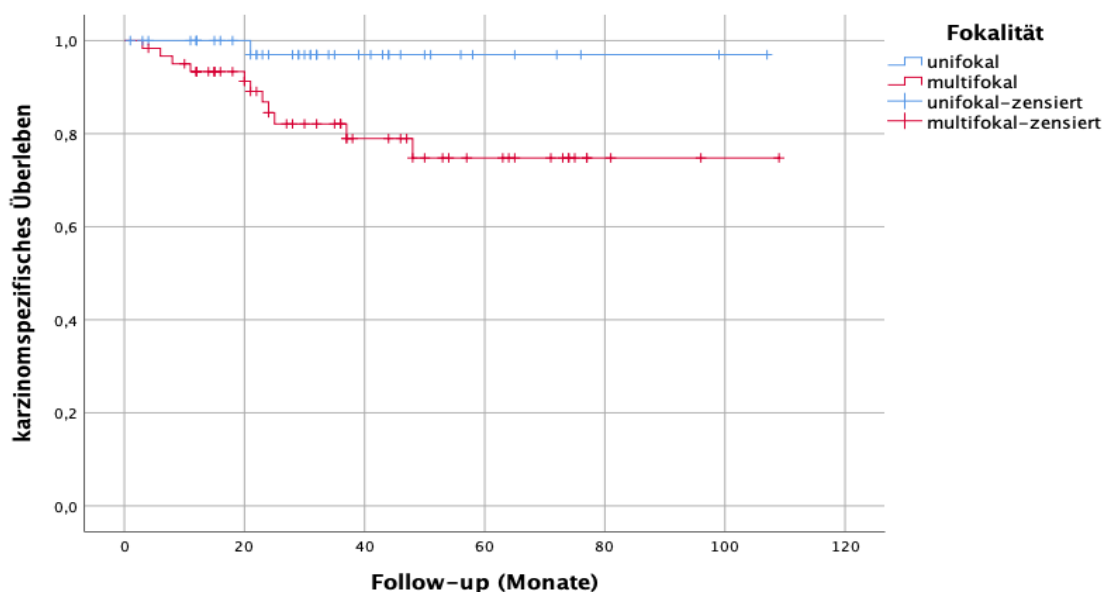


Abb. 31: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung der Fokalität auf das CSS ($p=0,021$).

3.2.5 Unterteilung der Kohorte ohne Frühzystektomien anhand klinischer und pathologischer Parameter

Im Folgenden wurde der Einfluss der AQP-mRNA-Expression auf das Überleben bei folgenden Hochrisikogruppen in der Kohorte ohne Frühzystektomien untersucht: G3 Tumoren, T1 Tumoren mit konkomittantem Cis, Tumoren größer/gleich 3 cm und multifokalen Tumoren.

Zudem wurde untersucht, ob die AQP-mRNA-Expression einen Einfluss auf das Ansprechen der Instillationstherapie hat (Tabelle 22).

Tabelle 22: Einfluss der Aquaporin-Expressionen in Bezug auf RFS, PFS und CSS in der anhand klinischer und pathologischer Parameter unterteilten Kohorte ohne Frühzystektomien.

Variable	Überleben	Aquaporinexpression	p-Wert
Patienten mit BCG Instillationstherapie	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS		Keine signifikanten Werte
	CSS	AQP3 Q1/2 besser	0,022
Patienten mit G3 Tumoren nach WHO1973	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS	AQP7 Q1/2 besser	0,045
		AQP9 Q1/2 besser	0,038
CSS		Keine signifikanten Werte	
Patienten mit multifokalem Tumor	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS		Keine signifikanten Werte
	CSS		Keine signifikanten Werte
Patienten mit konkomittantem Cis	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS		Keine signifikanten Werte
	CSS		Keine signifikanten Werte
Patienten mit Tumoren größer/gleich 3cm	RFS		Keine signifikanten Werte
	PFS		Keine signifikanten Werte
	CSS	AQP3 Q1/2 besser	0,036

3.2.5.1 Patienten mit BCG Instillationstherapie

Von 104 Patienten ohne Frühzystektomie erhielten 63 (60,6%) eine BCG Instillationstherapie. Die Patienten mit durchgeführter BCG Instillationstherapie werden im Folgenden in Bezug auf die AQP3, 4, 7, 9-Expression näher betrachtet.

3.2.5.1.1 Rezifivfreies Überleben (RFS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine in Bezug aufs RFS bei Patienten mit durchgeführter BCG Instillationstherapie gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.1.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine in Bezug aufs PFS bei Patienten mit durchgeführter BCG Instillationstherapie gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.1.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Von den 63 Patienten mit durchgeführter BCG Instillationstherapie zeigten 62 AQP3-mRNA-Expression (98,4%). Von 32 Patienten mit ΔCq Werten in Q1/2 verstarb einer tumorbedingt (3,1%).

Von 30 Patienten in Q3/4 verstarben 6 tumorbedingt (20%). Es zeigte sich dabei ein signifikant schlechteres tumorspezifisches Überleben der Patienten in Q3/4 ($p=0,022$) (Tabelle 22/ Abb. 32).

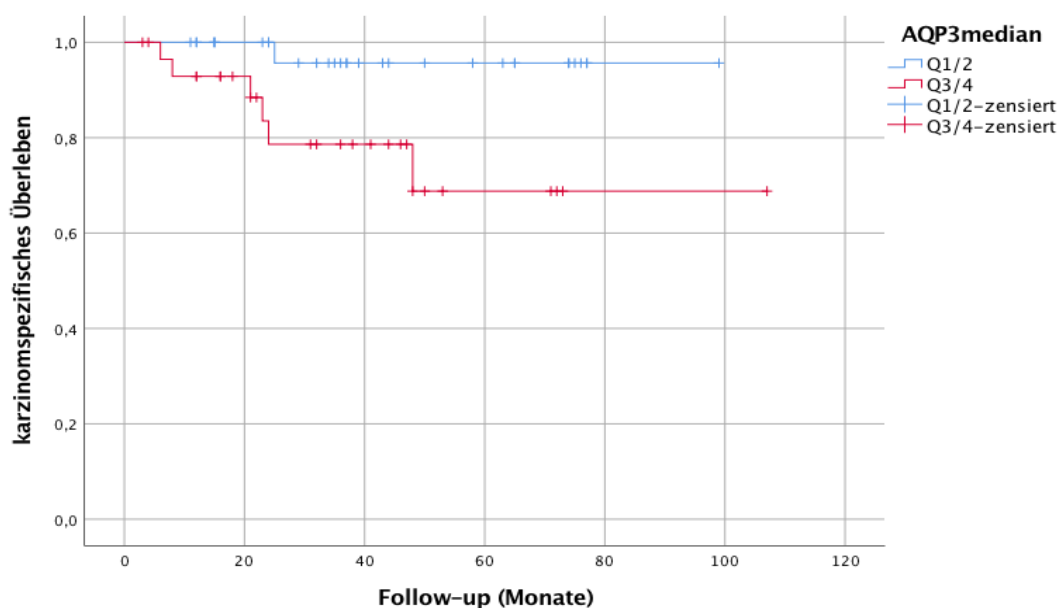


Abb. 32: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie, mit BCG Instillationstherapie und der Auswirkung der AQP3-mRNA-Expression auf das CSS (cut-off: Median; $p=0,022$).

Hinsichtlich der übrigen AQP-mRNA-Expressionen ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem CSS bei Patienten mit BCG Instillationstherapie.

3.2.5.2 Patienten mit einem G3 Tumor nach WHO1973

Von 104 Patienten ohne Frühzystektomie hatten 33 (31,7%) G2 und 71 (68,3%) G3 Tumore. Die Patienten mit G3 Tumoren werden im Folgenden in Bezug auf die AQP3, 4, 7, 9- Expression näher betrachtet.

3.2.5.2.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine in Bezug aufs RFS bei Patienten mit G3 Tumor gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.2.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

3.2.5.2.2.1 AQP7

Von 71 Patienten mit G3 Tumoren konnte bei 62 (87,3%) AQP7-mRNA gemessen werden.

Von 29 Patienten mit ΔCq Werten in Q1/2 entwickelte dabei einer eine Progression (3,4%). Von 33 Patienten in Q3/4 entwickelten 7 eine Progression (21,2%). Dies resultiert in einem signifikant schlechterem PFS von Patienten in Q3/4 ($p=0,045$) (Tabelle 22/ Abb. 33).

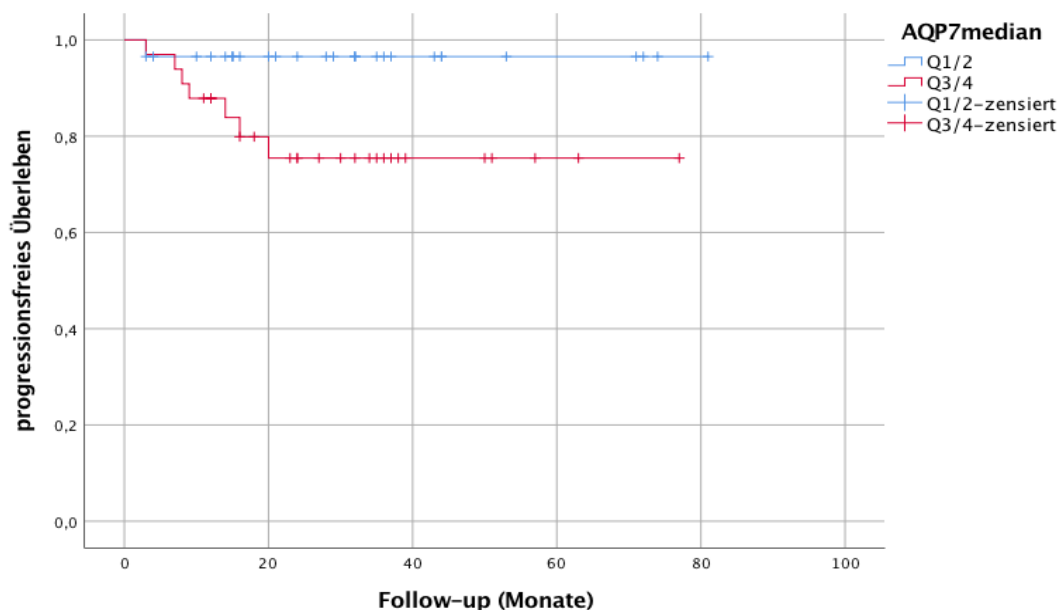


Abb.33: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie mit G3 Tumoren und der Auswirkung der AQP7-mRNA-Expression auf das PFS (cut-off: Median; $p=0,045$).

3.2.5.2.2.2 AQP9

Von 71 Patienten mit G3 Tumoren konnte bei 69 (97,2%) AQP9-mRNA gemessen werden.

Von 31 Patienten mit ΔCq Werten in Q1/2 entwickelte dabei 1 eine Progression (3,2%). Von 38 Patienten in Q3/4 entwickelten 8 eine Progression (21,1%). Dabei

ergab sich ein signifikant schlechteres PFS von Patienten mit einer hohen AQP9 mRNA-Expression (Q3/4; $p=0,038$) (Tabelle 22/ Abb. 34).

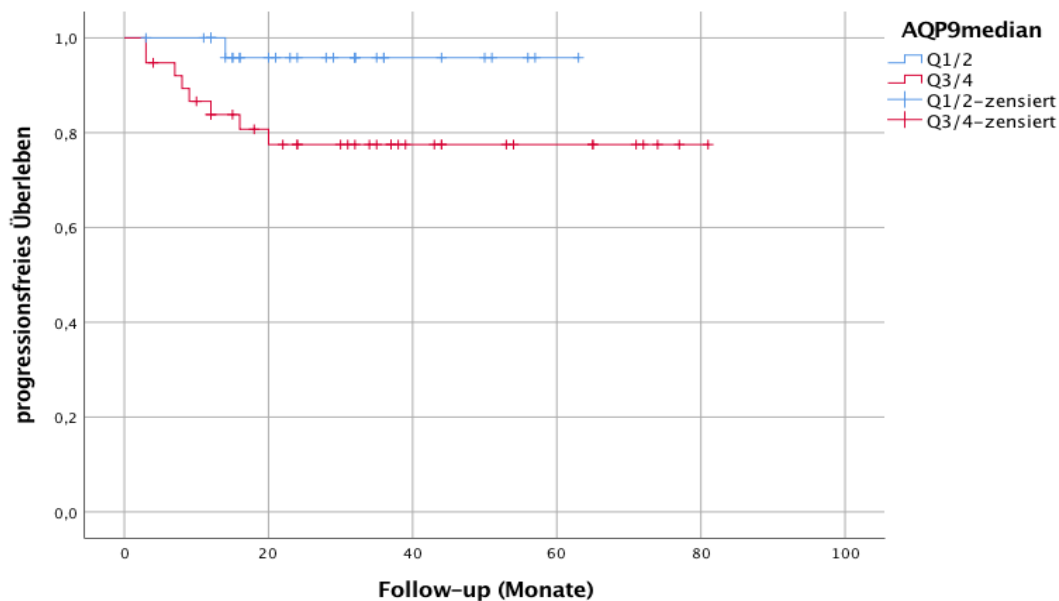


Abb.34: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie, mit G3 Tumoren und der Auswirkung der AQP9-mRNA-Expression auf das PFS (cut-off: Median; $p=0,038$).

3.2.5.2.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der unterschiedlichen Aquaporine in Bezug aufs CSS bei Patienten mit G3 Tumoren gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.3 Patienten mit multifokalen Tumoren

Von 104 Patienten ohne Frühzystektomie hatten 43 unifokale (41,3%) und 61 multifokale (58,7%) Tumore. Beim Vergleich der mRNA-Expression der unterschiedlichen Aquaporine in Bezug aufs RFS, PFS und CSS bei Patienten mit multifokalem Tumor ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.4 Patienten mit konkomittantem Cis

Von 104 Patienten ohne Frühzystektomie hatten 42 kein konkomittantes Cis (40,4%) und 62 ein konkomittantes Cis (59,6%). Beim Vergleich der mRNA-Expression der unterschiedlichen Aquaporine in Bezug aufs RFS, PFS und CSS bei Patienten mit konkomittantem Cis ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.5 Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm

Von 104 Patienten mit NMIBC wiesen 54 Patienten (51,9%) einen Tumor größer/gleich 3 cm auf. Von diesen verstarben 9 (16,7%) tumorbedingt. Von 50 Patienten (48,1%) mit einem Tumor kleiner als 3 cm verstarben 3 (6,0%) tumorbedingt.

Die Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm werden im Folgenden in Bezug auf die AQP3,4,7,9-mRNA-Expression näher betrachtet, um einen potenziellen Zusammenhang zu untersuchen.

3.2.5.5.1 Rezidivfreies Überleben (RFS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine in Bezug aufs RFS bei Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.5.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Beim Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Aquaporine in Bezug aufs PFS bei Patienten mit Tumoren größer/gleich 3 cm gab es keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 22).

3.2.5.5.3 Karzinomspezifisches Überleben (CSS)

3.2.5.5.3.1 AQP3

Von 54 Patienten mit einem Tumor größer/gleich 3 cm exprimierten 54 (100%) AQP3-mRNA.

Von 22 Patienten mit ΔCq Werten in Q1/2 entwickelte dabei 1 eine Progression (4,5%). Von 32 Patienten in Q3/4 entwickelten 8 eine Progression (25,0%). Dabei ergab sich ein signifikant schlechteres tumorspezifisches Überleben von Patienten mit einer hohen AQP3 mRNA-Expression (Q3/4; $p=0,036$) (Tabelle 22/ Abb. 35).

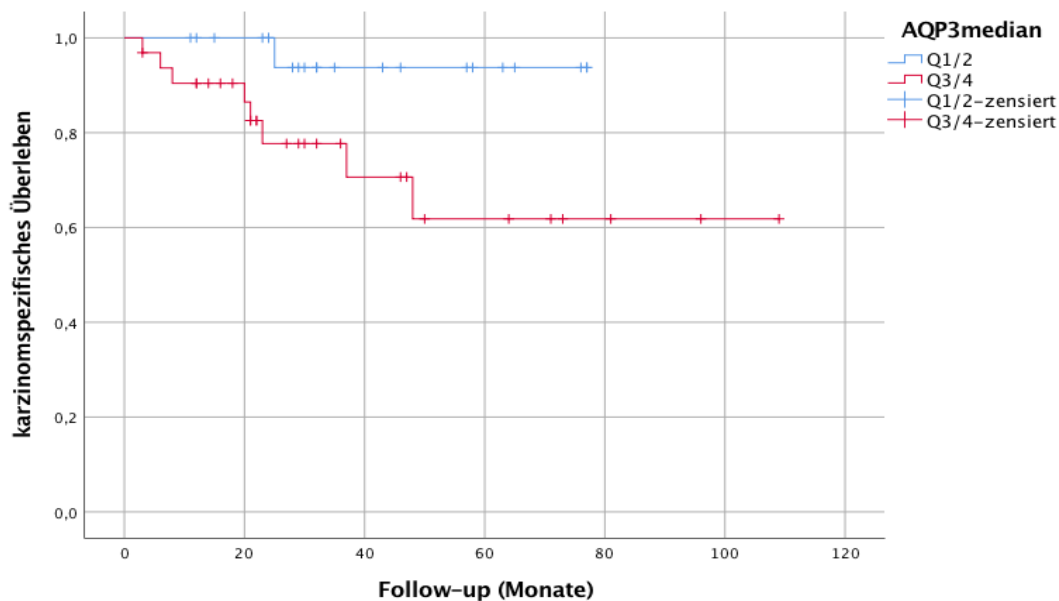


Abb. 35: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie, mit Tumoren größer/gleich 3 cm und der Auswirkung der AQP3-mRNA-Expression auf das CSS (cut-off: Median; $p=0,036$).

4 Diskussion

Das NMIBC stellt eine sehr heterogene Tumorentität dar. So gehören verhältnismäßig harmlose, primäre, kleine und unilokuläre pTaG1 Tumore ebenso dazu wie multilokuläre, rasch rezidivierende pT1G3 Tumore mit begleitendem Carcinoma in situ, die ein hohes Progressionsrisiko aufweisen. pT1G3 Tumore machen zwar nur 10-20% der NMIBC's aus, allerdings kommt es in bis zu 20-30% der Fälle zu einer Progression zu einem MIBC (86).

Standardisierte Aussagen zur optimalen Therapie sind im Gegensatz zu pTa Tumoren schwer zu treffen. Insbesondere beim high-risk NMIBC wären Entscheidungshilfen wünschenswert bezüglich der Frage, welche Patienten von einer Frühzystektomie profitieren würden und welche mit vertretbarem Risiko blasenerhaltend mittels Instillationstherapie behandelt werden könnten. In der EAU Guideline werden die Patienten mit high-risk Tumoren daher in eine weitere Subgruppe der highest-risk Tumoren unterteilt. Eingeschlossen werden Patienten mit einem pT1G3/high-grade Tumor, die darüber hinaus mit einem oder mehreren Nebenkriterien assoziiert werden können (87) (Tabelle 23):

Tabelle 23: Klinische und pathologische Parameter, die als Entscheidungshilfen für eine mögliche Frühzystektomie gelten. Aus den EAU Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer 2018 (87).

Hauptkriterium	Nebenkriterium
pT1 high-grade/G3 NMIBC im TUR Präparat	Multifokalität
	Tumorgröße ≥ 3 cm
	konkomittantes Cis
	pT1G3 Tumorrezidiv
	konkomittantes Cis in der prostatichen Urethra
	seltene aggressive histologische Unterformen

Diese Kriterien für eine mögliche Frühzystektomie sind auch in der S3-Leitlinie aufgenommen (88). Die Regensburger Arbeitsgruppe um Denzinger et al. untersuchten 2008 den Einfluss von Frühzystektomie im Vergleich zur verzögerten Zystektomie bei Progress zum muskelinvasiven Stadium, auf das tumorspezifische Überleben von high-risk pT1G3 Blasenkarzinompatienten. Sie identifizierten bei pT1G3 Tumoren vor allem Multifokalität, eine Größe ≥ 3 cm und das Auftreten eines konkomittanten Cis, als prognostisch ungünstige Faktoren und damit als Entscheidungshilfen für die Indikation einer Frühzystektomie (55). Die radikale Zystektomie ist eine der anspruchsvollsten urologischen Eingriffe und geht sowohl mit einer hohen Morbidität (Inkontinenz, sexuelle Funktionsstörung, Störung des Körperbildes, etc.) als auch mit einer erhöhten Mortalität einher.

Shabsigh et al. evaluierten 2009 1142 Patienten, die zwischen 1995 und 2005 einer radikalen Zystektomie unterzogen wurden. Dabei konnte bei 64% der Patienten (735/1142) mindestens eine Komplikation innerhalb der ersten 90 Tage postoperativ nachgewiesen werden. 68 unterschiedliche Komplikationen konnten 11 Kategorien zugeordnet werden. Gastrointestinale (29%), infektiöse (25%), die Wunde betreffende (15%), urogenitale (11%) und kardiale (11%) Zwischenfälle traten dabei am Häufigsten auf (89).

Aziz et al. analysierten 2013 597 Patienten, die 2011 in 18 Einrichtungen einer radikalen Zystektomie unterzogen wurden. Dabei bestätigte sich eine hohe 30-, 60- und 90-Tage Mortalität (2,7%/ 6,7%/ 9,0%) (90).

Die Entscheidung, ob eine Zystektomie im nicht-muskelinvasiven Stadium durchgeführt werden sollte, muss daher kritisch abgewogen werden und bedarf guter validierter Parameter.

Neben diesen klassischen klinischen und pathologischen Kriterien, die sich in der Risikoklassifizierung widerspiegeln, fehlen prognostische Biomarker, die es erleichtern, die Prognose des Patienten abzuschätzen und eine klare Aussage zur optimalen Therapie ermöglichen.

Potenzielle Biomarker, die in den letzten Jahren in Zusammenhang mit Harnblasenkarzinom in den Fokus rückten, sind Aquaporine.

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.5) beschrieben, kommt den Aquaporinen eine entscheidende Rolle in der Ausübung zahlreicher Funktionen unterschiedlicher Gewebe zu. Dabei senken sie die Energie, die für die Diffusion von Wasser durch eine Membran nötig ist, von 10-20 kcal/mol auf 5 kcal/mol, wodurch größere Mengen bewegt werden können (68). Ihr Vorkommen ist daher vielfältig. Dementsprechend äußert sich ein Funktionsverlust in unterschiedlichen Erkrankungen, je nachdem welche Kanäle in welchem Gewebe betroffen sind.

Aus diesem Grund sind Aquaporine schon länger Teil der Tumorforschung in unterschiedlichen Entitäten. Dabei kann eine Überexpression, bzw. ein Funktionsverlust je nach Tumor und Aquaporin sowohl positive, als auch negative Auswirkungen auf das Outcome haben (Kapitel 1.5.3).

2008 konnten Rubenwolf et al. AQP3, AQP4, AQP7, AQP9 und AQP11 im gesunden Urothel nachweisen. Vor allem AQP3 wurde dabei sowohl in vivo als auch in vitro stark exprimiert (80).

Im Folgenden konnte die gleiche Arbeitsgruppe 2012, Aquaporine auch in Urothelkarzinom nachweisen. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen der AQP3-Expression und Tumorinvasivität. So exprimierten 100% der pTa Tumore in der immunhistochemischen Färbung AQP3. Auf der anderen Seite exprimierte kein MIBC AQP3. 60% der pT1 Tumoren waren AQP3 positiv. Auch im Grading zeigte sich ein Zusammenhang: 100% der G1 Tumore, 89% der G2 und 28% der G3 Tumore waren AQP3 positiv (69).

2012 untersuchten Otto et al. den prognostischen Wert der immunhistochemischen AQP3-Expression in pT1 Tumoren. Von 87 Patienten waren 51 AQP3 positiv und 36 AQP3 negativ. Ein Expressionsverlust war dabei mit einem deutlich schlechteren progressionsfreien (20% vs. 72%, $p=0,020$) und auch einem schlechteren

rezidivfreien Überleben (22% vs. 60%, nicht statistisch signifikant) assoziiert. Ein statistisch signifikanter Einfluss auf das tumorspezifische Überleben nach 4 Jahren konnte nicht gezeigt werden (81).

Zum prognostischen Wert der immunhistochemischen AQP3-Expression in MIBC publizierten Rubenwolf et al. 2015 eine retrospektive Studie. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine hohe AQP3-Expression im Tumor mit einer statistisch signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (75% vs. 19%, $p=0,043$) und tumorspezifischen Überlebens (75% vs. 18% $p=0,030$) einhergeht (82). 2017 zeigten Breyer et al. auch in Cis eine sehr hohe immunhistochemische AQP3-Expression. Da Cis zu den schlecht differenzierten Tumorentitäten gehört, lag die Vermutung nahe, dass AQP3 nicht abhängig von der Tumordifferenzierung exprimiert wird, sondern von der Tumorinvasivität (83).

In der vorliegenden Arbeit, wurde die Auswirkung der mRNA-Expression verschiedener Aquaporine (3, 4, 7 und 9) bei pT1 Tumoren in einer größeren Kohorte untersucht. Neben der Gesamtkohorte wurden die Patienten gesondert untersucht, die keine Frühzystektomie erhielten, um gegebenenfalls Patienten, die von einer Frühzystektomie profitiert hätten, zu identifizieren.

In die retrospektive Studie konnten 130 Patienten mit einem Erstbefund eines pT1 NMIBC, die im Zeitraum von September 2007 bis November 2015 im Caritas Krankenhaus St. Josef in Regensburg einer TUR-B unterzogen wurden, eingeschlossen werden (Tabelle 9). Entsprechend der Leitlinienempfehlung erhielten alle Patienten im Abstand von 2-6 Wochen eine Nachresektion oder eine Frühzystektomie. Die retrospektive Erhebung des Follow-up erfolgte zwischen April und Oktober 2017. Bei 117 Patienten konnten die Aquaporin Messungen verwendet werden. Bei 13 Proben konnte nicht genügend mRNA nachgewiesen werden (10,0%). Ähnliche Anteile nicht messbarer mRNA gab es auch in vergleichbaren Studien im TUR-Gewebe von pT1 Tumoren (Breyer et. al 2017: 255/302 – 15,6% (91); Breyer et al. 2018: 296/334 - 11,3% (85)).

41,0% der Patienten wiesen ein konkomittantes Cis auf und 60,7% der Tumore waren multifokal. 70,9% waren G3 Tumore. 72,6% der Patienten wurden im Anschluss an die TUR-B mit einer Instillationstherapie behandelt. 55,6% erhielten dabei BCG Instillationen.

In einer vergleichbaren multizentrischen Studie von Vetterlein et al., zum Thema der Guideline Kohärenz bei pT1 NMIBC, in der 111 Patienten mit pT1 Tumoren eingeschlossen wurden, zeigten sich bis auf die Multifokalität ähnliche Verteilungen (G3 Tumore- 78,4%; konkomittantes Cis - 36,9%; Multifokalität – 44,1%; Instillationstherapie – 62,2%; davon 59,4% BCG Instillationen) (92).

Von den 117 verwertbaren Patienten entwickelten 40 ein Rezidiv (34,2%), 18 eine Progression (15,4%) und 15 Patienten verstarben tumorbedingt (12,8%). Weitere 16 Patienten verstarben nicht tumorbedingt (13,7%) und 86 (73,5%) lebten am Ende des Follow-up (Tabelle 9).

In 116 (97,5%) Tumorproben konnte AQP3-mRNA-, in lediglich 54 (45,4%) AQP4-mRNA-, in 102 (85,7%) AQP7-mRNA -und in 114 (95,8%) AQP9-mRNA valide gemessen werden (Tabelle 10).

Bei 13 der 117 Patienten wurde eine Frühzystektomie durchgeführt (11,1%), bei 11 eine sekundäre Zystektomie (9,4%) und 93 wurden blasenerhaltend therapiert (79,5%). Abzüglich der 13 Patienten mit Frühzystektomie entstand neben der Gesamtkohorte, die Kohorte ohne Frühzystektomie (KOF), mit 104 Patienten. Hiervon wiesen 68,3% G3 Tumoren auf. 40,4% der Patienten zeigten ein konkomittantes Cis. 58,7% der Tumore waren multifokal. Bei 79,8% der Patienten in der KOF erfolgte im Anschluss an die TUR-B eine Instillationstherapie. 60,6% wurden dabei mit BCG therapiert.

36 Patienten entwickelten ein Rezidiv (34,6%), 14 eine Progression (13,5%) und 12 Patienten verstarben tumorbedingt (11,5%). Weitere 15 Patienten verstarben nicht tumorbedingt (14,4%) und 77 (74,0%) lebten am Ende des Follow-up (Tabelle 17).

In 103 (99,0%) Tumorproben konnte AQP3-mRNA-, in lediglich 48 (46,2%) AQP4-mRNA-, in 89 (85,6%) AQP7-mRNA -und in 101 (97,1%) AQP9-mRNA gemessen werden (Tabelle 18).

Aquaporin 3 wies aufgrund des Nachweises auf mRNA Ebene gleichbleibend hohe Expressionen auf. Sowohl bei der Gesamtkohorte, als auch bei den multifokalen Tumoren, den G3 Tumoren und den Tumoren mit konkomittantem Cis.

In der Gesamtkohorte konnte bei 116 Patienten (99,1%) AQP3-mRNA nachgewiesen werden. Auch bei 98,8 % der G3 Tumoren, 97,9% der Cis und 98,6% der multifokalen Tumoren konnte AQP3 nachgewiesen werden (Tabelle 11).

In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen AQP3-mRNA-Expression und RFS festgestellt werden ($p=0,783$). Auch beim PFS ($p=0,796$) und CSS ($p=0,746$) zeigten sich keine signifikanten Korrelationen (Kapitel 3.1.5).

Sowohl Rubenwolf et al., als auch Otto et al. detektierten Aquaporin 3 mit Hilfe von Immunhistochemie auf Proteinebene und nicht wie in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von RT-qPCR auf mRNA-Ebene, was mögliche Abweichungen der Ergebnisse erklären könnte. Darüber hinaus analysierten beide kleinere Kohorten (Otto et al.: $n=20$. /Rubenwolf et al.: $n=87$).

Außerdem ist der immunhistochemische Nachweis von Aquaporinen in Tumorgewebe untersucherabhängig und nicht eindeutig quantifizierbar, was ein Vorteil des Aquaporin Nachweises auf mRNA-Ebene ist.

Der Aquaporinnachweis erfolgte in unserer Studie indirekt über die Messung der mRNA, die für die unterschiedlichen Aquaporine kodiert. Die Ergebnisse dieser Nachweismethode müssen ebenfalls kritisch beurteilt werden. So kodiert zwar die nachgewiesene mRNA für die zu untersuchenden Aquaporine, deren Translation ist allerdings nicht garantiert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass neben Tumorgewebe auch gesundes Gewebe in Paraffin fixiert wurde, deren AQP mRNA ebenfalls gemessen wird.

Das resezierte Blasentumorgewebe wurde als Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) gelagert. Die RNA Isolierung aus diesen fixierten Geweben birgt viele Fehlerquellen. RNA ist sehr instabil und muss sehr sorgfältig behandelt werden. Bei der Fixierung bilden sich „cross links“ mit Formaldehyd, die nicht immer vollständig gelöst werden. Darüber hinaus ist RNA sehr empfindlich

gegenüber Temperaturschwankungen. Bei der Lagerung der Proben kann die Menge an RNA reduziert werden. So konnten von 130 Tumorproben 13 nicht verwendet werden, da zu wenig RNA extrahiert werden konnte. Zu wenig vorhandene RNA erschwert die Durchführung der RT-PCR und damit den Nachweis von Aquaporinen. Eine weitere Fehlerquelle bietet die Kontamination mit RNase, die über die Haut verschleppt werden kann und die RNA Menge reduziert. DNA Kontamination kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, trotz Bearbeitung der Proben mit DNase.

So bietet sowohl der Aquaporin Nachweis auf mRNA Ebene, als auch der immunhistochemische Nachweis Fehlerquellen, die die Abweichungen neben der unterschiedlichen Kohortengröße und der unterschiedlichen Aquaporin Bestimmungen, erklären können.

Allerdings konnten auch wir den Zusammenhang zwischen erhöhter AQP3-Expression und besserer Tumordifferenzierung, feststellen. AQP3-mRNA-Expression korrelierte mit besserem Grading nach WHO 1973 ($r=-0,260/ p=0,005$). Darüber hinaus wiesen Patienten mit hoher APQ3-mRNA-Expression im Gewebe seltener ein konkomittantes Cis auf. Dabei korrelierte Aquaporin 3 negativ mit konkomittanten Cis ($r=-0,254/ p=0,006$) (Tabelle 12). Aggressivere Tumore, also pT1G3 Tumore und pT1 Tumore mit einem konkomittanten Cis, scheinen durch einen AQP3-mRNA-Verlust gekennzeichnet zu sein.

Diesen Effekt gilt es weiter zu beobachten, da sowohl erhöhtes Grading WHO 1973, als auch das Vorhandensein eines konkomittanten Cis bei pT1 Tumoren einen schlechten Einfluss auf das Outcome der Patienten hat. Vor allem die Progressionswahrscheinlichkeit erhöht sich dabei enorm, was sich im EORTC Progression Score widerspiegelt.

So wirkt sich AQP3-Expression indirekt auch auf die Progressionswahrscheinlichkeit aus, auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein direkter signifikanter Zusammenhang zum EORTC Progression Score gezeigt werden konnte.

Der Einfluss eines konkomittanten Cis aufs Überleben war auch in unserer Studie zu sehen. Bei den Patienten mit AQP3-mRNA-Expression im Tumorgewebe zeigte sich

eine Progressionswahrscheinlichkeit von 15,5% in der Gesamtkohorte und 23,4% in der Kohorte mit konkomittantem Cis.

Aber auch die Zahl der Rezidive stieg von 34,5 % in der Gesamtkohorte auf 42,6% in der Kohorte mit konkomittantem Cis (Tabelle 11).

Wie bereits oben beschrieben spielt das Vorhandensein eines konkomittanten Cis und eines G3 Tumors aktuell eine entscheidende Rolle in der Frage, ob eine Frühzystektomie indiziert ist.

Allerdings korrelierte AQP3 positiv mit der TumorgroÙe ($r=0,188/ p=0,043$) (Tabelle 12), die in der S3-Leitlinie ebenfalls einen Indikator für eine mögliche Frühzystektomie darstellt.

Darüber hinaus zeigte sich in der Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der Patienten ohne Frühzystektomie, mit Tumoren größer/gleich 3 cm, die eine hohe AQP3-mRNA-Expression mit ΔCq Werten in Q3/Q4 aufwiesen, ein signifikant schlechteres Überleben ($p=0,036$) (Tabelle 22/ Abb. 35).

Dies könnte darin begründet liegen, dass in einer größeren Tumormasse, die per se mit schlechterem tumorspezifischem Überleben einhergeht, mehr Aquaporin vorhanden ist. Die Messung einer standardisierten Tumormenge wäre mittels eines Tissue Microarrays (TMA) möglich und sollte in einer Validierungsstudie durchgeführt werden, um diesen Confounder zu überprüfen. Nachteil eines TMA ist natürlich die fehlende Messung im gesamten Tumor, da auch intratumoral eine genetische Heterogenität vorliegen könnte.

Sollte eine AQP3-Expression seltener mit Cis und G3 Tumoren assoziiert sein, könnte es eine wichtige Rolle als prognostischer Marker, wie schon in den vorherigen Studien vermutet, spielen.

Bei Patienten ohne Frühzystektomie, bei denen eine BCG-Instillationstherapie durchgeführt wurde, zeigte eine niedrige AQP3-Expression mit ΔCq Werten in Q1/2 ein signifikant besseres karzinomspezifisches Überleben ($p=0,022$) (Tabelle 22/ Abb. 32). Bei dieser Patientengruppe scheinen geringere Aquaporinexpressionen ein besseres Ansprechen auf die BCG-Instillationstherapie prädictieren zu können. Einen Einfluss von AQP3-mRNA auf das Ansprechen von Chemotherapie wurde bisher

noch nicht untersucht, da die BCG-Therapie die Standardtherapie des T1 NMIBC darstellt und eine Instillationstherapie mit z.B. Mitomycin C nur in Ausnahmefällen (mangelnde BCG-Verfügbarkeit) erfolgt.

Etwaige Interaktionen zwischen Aquaporinen und dem BCG-Erreger, bzw. der daraus entstehenden Immunreaktion, könnten den Zusammenhang erklären. Diese Beobachtungen gilt es weiter zu untersuchen. Eine hohe AQP3-mRNA-Expression könnte somit die Entscheidung, keine BCG-Instillationstherapie durchzuführen und eher eine Frühzystektomie zu wählen, unterstützen. Dies muss selbstverständlich prospektiv untersucht werden.

AQP4 konnte sowohl in Glioblastomen, als auch beim Magenkarzinom und in Brustkrebs mit schlechterem Outcome in Verbindung gebracht werden. Es lässt sich also vermuten, dass AQP4 auch beim Harnblasenkarzinom einen negativen Einfluss ausüben kann. Allerdings fehlen signifikante Korrelationen, um genaue Aussagen treffen zu können.

Aquaporin 4 zeigte in unserer Studie die geringste messbare mRNA-Menge und somit mRNA-Expression der vier gemessenen Aquaporine. Nur in 46,1% der Gesamtkohorte konnte AQP4-mRNA valide gemessen werden. Während AQP3, 7 und 9 annähernd konstante Expressionen aufwiesen, variierte die AQP4-Expression im Vergleich der Gesamtkohorte, der Kohorte der G3 Tumoren, der Kohorte mit konkomittantem Cis und der Kohorte der multifokalen Tumoren. Sie sank im Vergleich zur Gesamtkohorte (46,1%) bei den G3 Tumoren (41,0%) und stieg bei den Tumoren mit konkomittantem Cis (89,6%) und multifokalen Tumoren (50,7%) (Tabelle 11). AQP4 korrelierte positiv mit AQP7 ($r=0,295/ p=0,032$) (Tabelle 12), zeigte ansonsten allerdings keine signifikanten Korrelationen zu klinischen oder pathologischen Parametern. Ebenfalls konnte kein Einfluss auf das Überleben beobachtet werden. Dies und die Tatsache, dass es in weniger als 50% der Tumoren detektiert werden konnte, macht die mRNA-Messung von AQP4 zu einem ungeeigneten prognostischen Marker. Die immunhistochemische Expression von AQP4 im Blasentumorgewebe zu untersuchen, wäre hier sehr aufschlussreich, um zu sehen, ob sich die fehlende mRNA-Expression auch in einem vollständigen

Expressionsverlust auf Proteinebene widerspiegelt und möglicherweise einen prognostischen Effekt hat. Dies sollte ein Teil künftiger Untersuchungen sein.

Zu Aquaporin 7 gibt es aktuell nur wenige Studien in Bezug auf die Expression und Rolle in Tumorgeweben. Bründl et al. wiesen 2018 Aquaporin 7 zusammen mit 1,3,4,8,10 und 11 beim Prostatakarzinom nach (93). Prognostische Aussagen konnten allerdings nicht getroffen werden. Die vorliegende Studie ist die erste, die die Rolle von AQP7 im Urothelkarzinom untersucht.

AQP7 zeigte niedrigere Expressionen als AQP3. In der Gesamtkohorte konnte bei 87,2% der Patienten AQP7-mRNA nachgewiesen werden.

Dabei stieg die Expression leicht bei den G3 Tumoren, multifokalen Tumoren und den Tumoren mit konkomittantem Cis im Vergleich zu der Gesamtkohorte (Tabelle 11).

Im Gegensatz zu AQP3 zeigte AQP7 eine positive Korrelation mit dem Grading nach WHO1973 ($r=0,203/ p=0,041$). Darüber hinaus zeigte sich eine positive Korrelation mit Aquaporin 4 ($r=0,295/ p=0,032$) (Tabelle 12). Aquaporin7-mRNA-Expression scheint also mit erhöhtem Grading nach WHO1973 und somit mit einer schlechteren Tumordifferenzierung einherzugehen.

AQP7 zeigte keine signifikante Korrelation mit dem RFS und PFS. In der Gesamtkohorte konnte jedoch ein schwacher signifikanter Zusammenhang zwischen AQP7 und CSS festgestellt werden. Dabei scheinen höhere AQP7-mRNA-Expressionen mit ΔCq Werten in Q3/4 mit schlechterem Überleben zu korrelieren ($p=0,042$) (Abb. 13).

Auch in der Hochrisikogruppe der pT1G3 Tumoren, zeigten höhere AQP7-mRNA-Expressionen mit ΔCq Werten in Q3/4 ein signifikant schlechteres CSS als niedrige ($p=0,036$) (Tabelle 16/ Abb. 22).

So scheint AQP7 bei aggressiven Tumoren hochreguliert zu werden und einen negativen Einfluss aufs karzinomspezifische Überleben zu haben.

In der Kohorte ohne Frühzystektomien zeigten hohe AQP7-mRNA-Expressionen mit ΔCq Werten in Q3/4 bei Patienten mit G3 Tumoren ein signifikant schlechteres PFS ($p=0,045$) (Tabelle 22/ Abb. 33), was diese Ergebnisse unterstützt.

Die Messung der AQP7-mRNA-Expression im Tumorgewebe könnte somit vor allem bei Patienten mit G3 Tumoren unter Einschluss weiterer Risikofaktoren helfen, diese Hochrisikopatienten frühzeitig einer Frühzystektomie (bei hoher AQP7-mRNA-Expression) zuzuführen.

Aquaporin 7 könnte zusammen mit Aquaporin 3 einen vielversprechenden Marker für die Prognose von pT1 Tumoren darstellen. Es könnte sich lohnen, die Rolle von AQP7 in NMIBC, weiter zu erforschen. Vor allem bei Patienten mit G3 Tumoren könnte es ein relevanter Marker für die Entscheidung, ob eine Frühzystektomie indiziert ist, sein.

Ähnlich wie zu AQP7 gibt es aktuell keine Studien zum Einfluss der AQP9-Expression in Tumorgewebe. Die vorliegende Studie war die erste, die sich mit der Rolle von AQP9 in Urothelkarzinomgewebe befasste.

Auch AQP9 zeigte ähnlich wie AQP3 hohe Expressionen, so konnte in der Gesamtkohorte bei 97,4% der Tumore AQP9-mRNA nachgewiesen werden (Tabelle 11).

AQP9-mRNA-Expression zeigte signifikante Korrelationen mit prognostisch ungünstigen pathologischen Parametern wie Multifokalität und konkomittantem Cis. AQP9 korrelierte positiv mit der Fokalität ($r=0,218$ / $p=0,020$), dem EORTC Progression Score ($r=0,206$ / $p=0,028$) und mit konkomittantem Cis ($r=0,280$ / $p=0,003$) (Tabelle 12). Auch in der Kohorte ohne Frühzystektomie bestätigten sich diese signifikanten Korrelationen (Tabelle 19).

Wie bereits oben beschrieben gelten Multifokalität und konkomittantes Cis, sowohl in der S3-Leitlinie, als auch in der Studie von Denzinger et al., als Parameter für eine mögliche Frühzystektomie. Vor allem bei multifokalen pT1G3 Tumoren mit einem konkomittantem Cis und/oder großen Tumoren ($\geq 3\text{cm}$) sollte nach Denzinger et al. eine Frühzystektomie erwogen werden. Auch in der vorliegenden Studie konnte der Einfluss von Multifokalität aufs Überleben gezeigt werden. Multifokale Tumore

zeigten ein signifikant schlechteres RFS ($p=0,018$), PFS ($p=0,010$) und CSS ($p=0,009$), als unifokale (Tabelle 15).

Aquaporin 9 korreliert damit positiv mit zwei von drei Risikofaktoren, die als Entscheidungshilfen für eine Frühzystektomie verwendet werden können.

Wie bei AQP3 und 4 fanden sich auch bei AQP9 keine signifikanten Korrelationen mit dem RFS, PFS und CSS in der Gesamtkohorte (Kapitel 3.1.5).

Allerdings konnte wie schon bei der AQP7-mRNA-Expression, bei Patienten mit pT1G3 Tumoren, ein positiver Einfluss einer niedrigen AQP9-mRNA-Expression mit ΔCq Werten in Q1/2 auf das PFS ($p=0,029$) beobachtet werden (Tabelle 16/ Abb. 21). Auch bei der KOF mit G3 Tumoren zeigte niedrige AQP9-Expression ein statistisch signifikant besseres PFS in Q1/2 ($p=0,038$) (Tabelle 22/ Abb.34). Diese Beobachtungen unterstützen die beschriebenen Korrelationen und festigen die Vermutung eines negativen Einflusses einer hohen AQP9 mRNA-Expression auf das Outcome der Patienten.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich somit einige interessante Korrelationen für die AQP9-mRNA-Expression, insbesondere in Hochrisikogruppen des pT1-Blasenkarzinoms, die es weiter zu untersuchen gilt. Vor allem die Korrelation mit Multifokalität und dem Auftreten von konkomitanten Cis gilt es weiter zu beobachten.

Die Aussagekraft der Arbeit ist von folgenden Limitationen abhängig:

In der Arbeit wurde das Vorhandensein von Aquaporinen im Tumorgewebe auf mRNA Ebene untersucht. Anhand der berechneten ΔCq Werte kann man Rückschlüsse auf das Vorhandensein dieser direkten Aquaporinvorstufe ziehen. Es kann allerdings nicht mit Sicherheit gesagt werden, wie viel mRNA letztendlich in fertige Aquaporine translatiert wird. Darüber hinaus fällt es schwer einen genauen cut-off zu ermitteln, ab wann man ein Gewebe als Aquaporin positiv oder negativ bezeichnen kann, bzw. Nachweisgrenzen festzulegen. In der vorliegenden Arbeit scheint der Median die prognostisch relevanteste und sinnvollste Option darzustellen.

Wie bereits auf Seite 90f beschrieben, wurde das resezierte Blasenmorgewebe als Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) gelagert. Die RNA Isolierung aus diesen fixierten Geweben birgt ebenfalls Fehlerquellen.

Das retrospektive Studiendesign erschwerte die Datenerhebung und Erhebung des Follow-up.

5 Zusammenfassung

Schon lange wird nach Biomarkern gesucht, die neben klinischen und pathologischen Kriterien, eine klare Aussage über die Prognose von Patienten mit high-risk NMIBC ermöglichen und die Indikation einer möglichen Frühzystektomie erleichtern.

Die Auswirkung von Aquaporin 3 auf die Prognose vom Harnblasenkarzinom ist in mehreren Studien, die vorliegende Arbeit eingeschlossen, untersucht worden. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen (hoher) AQP3-Expression und geringerer Tumorinvasivität, bzw. einem verbessertem Outcome.

Bei Otto et al. war fehlende Expression mit einem deutlich schlechteren progressionsfreien (20% vs. 72%, $p=0,020$) und auch einem schlechteren rezidivfreien Überleben (22% vs. 60% (nicht statistisch signifikant) in NMIBC assoziiert.

Bei Rubenwolf et al. ging eine hohe AQP3-Expression in MIBC mit einer statistisch signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (75% vs. 19% $p=0,043$) und tumorspezifischen Überlebens (75% vs. 18% $p=0,030$) einher.

Zwar konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen verbessertem Überleben und der AQP3-mRNA-Expression herstellen, allerdings sprechen auch unsere Ergebnisse für einen protektiven Effekt von AQP3 in NMIBC.

Wir konnten zeigen, dass AQP3-Expression mit einer verringerten Zahl G3 Tumore ($r=-0,260/ p=0,005$) und Tumore mit konkomittantem Cis ($r=-0,254/ p=0,006$) einhergeht und somit einen positiven Einfluss auf das Outcome der Patienten nimmt.

AQP3 bleibt ein spannendes Protein, dessen prognostischer Einfluss aufs NMIBC in weiteren Studien mit prospektivem Studiendesign und an größeren Kohorten untersucht werden sollte.

AQP4 wurde in mehreren Studien mit schlechtem Tumoroutcome in Verbindung gebracht. Auch wir konnten schlechteres RFS, PFS und CSS zeigen. Allerdings zeigten sich keine statistisch signifikanten Werte. Die Rolle von AQP4 in NMIBC scheint im Gegensatz zur Glioblastomforschung gering, insbesondere da nur in 45,4% der Fälle AQP4-mRNA nachgewiesen werden konnte.

Patienten mit hoher AQP7-mRNA-Expression zeigten in unserer Studie vermehrt schlechtere Tumordifferenzierung im Grading nach WHO1973 ($r=0,203$ / $p=0,041$) und damit den gegenteiligen Effekt von AQP3-mRNA-Expression.

In der Kaplan Meier Überlebenszeitanalyse ging niedrige AQP7-mRNA-Expression mit besserem CSS einher ($p=0,042$).

Auch Patienten mit G3 Tumoren zeigten besseres CSS unter niedriger AQP7-mRNA-Expression ($p=0,036$).

In der Kohorte ohne Frühzystektomien konnte bei Patienten mit G3 Tumoren darüber hinaus ein Einfluss hoher AQP7-mRNA-Expressionen auf schlechteres PFS ($p=0,045$) festgestellt werden.

So scheint AQP7 bei aggressiven Tumoren hochreguliert zu werden und einen negativen Einfluss aufs Überleben zu haben.

AQP9 zeigte zusammen mit AQP7 in unserer Studie die vielversprechendsten Werte. AQP9-Expression scheint das Risiko für multifokale Tumore ($r=0,218$ / $p=0,020$) und Tumore mit konkomittantem Cis ($r=0,280$ / $p=0,003$) zu erhöhen und geht darüber hinaus mit einem erhöhten EORTC Progression Score einher ($r=0,206$ / $p=0,028$). AQP9-Expression nimmt damit Einfluss auf zwei von drei Risikofaktoren, die in der Publikation von Denzinger et al. als Indikatoren für eine Frühzystektomie in pT1G3 Tumoren beschrieben wurden. Darüber hinaus zeigte niedrige AQP9-mRNA-Expression bei Patienten mit pT1G3 Tumoren ein signifikant besseres PFS ($p=0,029$). Diese Beobachtungen unterstützen die beschriebenen Korrelationen und festigen die Vermutung eines negativen Einflusses von AQP9 aufs Outcome der

Patienten. Es könnte sich lohnen den Einfluss von AQP9 in NMIBC und auch in MIBC auf das Outcome der Patienten weiter zu untersuchen.

Darüber hinaus zeigte sich bei Patienten ohne Frühzystektomie mit BCG-Instillationstherapie signifikant besseres CSS bei niedriger AQP3-mRNA-Expression ($p=0,022$).

Weitere Untersuchungen könnten dabei helfen, klarere Aussagen treffen zu können, welche Patienten mit BCG Instillationstherapie von einer Frühzystektomie profitieren könnten.

AQP3, 4, 7 und 9 werden einzeln betrachtet nur schwer die Entscheidung erleichtern, ob eine Frühzystektomie indiziert ist. Zusammen betrachtet, geht in der vorliegenden Arbeit eine niedrige AQP3- zusammen mit einer hohen AQP9- und AQP7-mRNA-Expression, mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einher und könnte als prognostische Entscheidungshilfe, ob eine Frühzystektomie durchgeführt werden sollte, in Zukunft eine Rolle spielen. So könnten vor allem Patienten mit pT1G3 Tumoren, bei hoher AQP7 und AQP9 Expression im Tumorgewebe von einer Frühzystektomie profitieren.

Weitere Untersuchungen in einem größeren Patientenkollektiv und mit prospektivem Studiendesign wären erstrebenswert.

6 Anhang

Zitierprogramm: Mendeley

Zitierstil: National library of medicine

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AQP	– Aquaporin
BCG	– Bacillus-Calmette-Guerin
Buffer RLT	– Buffer for lysing cells and tissues
CALM2	– Calmodulin
cDNA	– Complementary DNA
Cis	– Carcinoma in situ
CK 20	– Zytokeratin 20
Cq	– Quantification Cycle
CSS	– Cancer-specific survival; Karzinomspezifisches Überleben
DGU	– Deutsche Gesellschaft für Urologie
DNA	– Desoxyribonucleic acid
FAM	– 6-Carboxyfluorescein
FFPE	– Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
EORTC	– European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FRET	– Fluorescence Resonance Energy Transfer
IARC	– International Agency for Research on Cancer
ISUP	– International Society of Urothology
KOF	– Kohorte ohne Frühzystektomie
MBG	– Minor groove binder
MIBC	– Muscle invasive bladder cancer; muskelinvasives Blasenkarzinom
MMC	– Mitomycin C
mRNA	– Messenger RNA
NMIBC	– Non-muscle-invasive bladder cancer; nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom
NTC	– No template controll
PCR	– Polymerase chain reaction
PDD	– Photodynamische Diagnostik
PFS	– Progression-free survival; Progressionsfreies Überleben

PUNLMP	– Papilläre urotheliale Neoplasien mit niedrigem malignem Potenzial
REF	– Referenzgen
RFS	– Recurrence-free survival; Rezidivfreies Überleben
RFU	– Relative fluorescence units
RNA	– Ribonucleic acid
RT4	– Bladder transitional cell papilloma (grade 1 carcinoma)
RT-qPCR	– Reverse Transkriptase - quantitative Echtzeit-PCR
S	– Sample
TBP1	– TATA Box binding protein 1
TMA	– Tissue Microarrays
TNBC	– Triple-negative breast cancer
TUR	– Transurethrale Resektion
WHO	– World-Health-Organisation

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM – Klassifikation – Urothelkarzinom der Harnblase; adaptiert nach S3-Leitlinie - September 2016 (11).	9
Tabelle 2: Punktesystem für die Berechnung der Rezidiv -und Progressionswahrscheinlichkeit; adaptiert nach Sylvester et al. Eur Urol. 2006 (13).	11
Tabelle 3: Rezidivwahrscheinlichkeit je nach Recurrence Score; adaptiert nach Sylvester et al. Eur Urol. 2006 (14).	11
Tabelle 4: Progressionswahrscheinlichkeit je nach Progression Score; adaptiert nach Sylvester et al. Eur Urol. 2006 (14).	12
Tabelle 5: Zuordnung unterschiedlicher Tumorstadien zu den Risikogruppen low, intermediate und high- risk nach S3-Leitlinie - September 2016 (15).	12
Tabelle 6: Vorkommen, Gename und Chromosomlokalisierung der menschlichen Aquaporine; adaptiert nach Magni et al., Proteomic knowledge of human aquaporins. Bd. 6, Proteomics. 2006 (67).	22
Tabelle 7: Erhobene allgemeine, klinische und pathologische Parameter.	27
Tabelle 8: Inhalt des Master Mixes.	32
Tabelle 9: Deskriptive Statistik der Gesamtkohorte.	44

Tabelle 10: Errechnete ΔCq Werte der mRNA Messungen der Aquaporine 3,4,7 und 9.	45
Tabelle 11: Anzahl der Ereignisse bei Patienten der Gesamtkohorte, mit G3 Tumoren, mit multifokalen Tumoren und mit konkomittantem Cis in Bezug auf die Aquaporinexpression.	48
Tabelle 12: Korrelation der Aquaporin-mRNA-Expression mit klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.	49
Tabelle 13: Korrelationen zwischen AQP3, AQP4, AQP7 und AQP9.	51
Tabelle 14: Dauer des RFS, PFS, CSS und die ΔCq Werte der Aquaporine im Vergleich.	52
Tabelle 15: Korrelation zwischen der Fokalität des Tumors, der Art der Therapie, Grading nach WHO 2004/2016 und RFS, PFS und CSS.	56
Tabelle 16: Korrelationen zwischen der anhand klinischer und pathologischer Parameter unterteilten Gesamtkohorte und unterschiedlicher Aquaporinexpressionen in Bezug aufs RFS, PFS und CSS.	62
Tabelle 17: Deskriptive Statistik der Kohorte ohne Frühzystektomien.	66
Tabelle 18: Errechnete ΔCq Werte der mRNA Messungen der Aquaporine 3,4,7 und 9.	67
Tabelle 19: Korrelation der Aquaporin-mRNA-Expression mit klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.	70
Tabelle 20: Dauer des RFS, PFS, CSS und die ΔCq Werte der Aquaporin Quartilen im Vergleich.	72
Tabelle 21: Korrelation zwischen der Fokalität des Tumors, Grading WHO 2004/2016 und RFS, PFS und CSS.	76
Tabelle 22: Einfluss der Aquaporin-Expressionen in Bezug auf RFS, PFS und CSS in der anhand klinischer und pathologischer Parameter unterteilten Kohorte ohne Frühzystektomien.	80
Tabelle 23: Klinische und pathologische Parameter, die als Entscheidungshilfen für eine mögliche Frühzystektomie gelten. Aus den EAU Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer 2018 (87).	86

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beispiel einer Messreihe einer 96 Wells Platte; Übersicht aus Biorad CFX Manager Software.	34
Abb. 2: Screenshots aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU (relative fluorescence unit) in Abhängigkeit der Zyklen einer TBP1 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well A, C und D.	37
Abb. 3: Screenshots aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer CALM 2 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well A, C und D.	38
Abb. 4: Screenshot aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP3 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well C, D und E.	39
Abb. 5: Screenshot aus Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP4 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well B.	40
Abb. 6: Screenshot aus der Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP7 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well C und F.	41
Abb. 7: Screenshot aus der Biorad CFX Manager Software - Graphische Darstellung der RFU in Abhängigkeit der Zyklen einer AQP9 Messung. Hier dargestellt ist die Messung der mRNA in Well A, C, D und F.	42
Abb. 8: Verteilung der ΔCq Werte der AQP3-mRNA-Expression.	46
Abb. 9: Verteilung der ΔCq Werte der AQP4-mRNA-Expression.	46
Abb. 10: Verteilung der ΔCq Werte der AQP-7-mRNA-Expression.	47
Abb. 11: Verteilung der ΔCq Werte der AQP9-mRNA-Expression.	47
Abb. 12: Balkendiagramm zur Darstellung des Ausmaßes der Korrelation zwischen der mRNA-Expression von AQP3,4,7 und 9 und klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.	50
Abb. 13: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der AQP7 mRNA-Expression auf das CSS in der Gesamtkohorte, (cut-off: Median; $p=0,042$).	55
Abb. 14: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Fokalität auf das RFS ($p=0,018$).	57

Abb. 15: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Fokalität auf das PFS ($p=0,010$).	58
Abb. 16: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Fokalität auf das CSS ($p=0,009$).	58
Abb. 17: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Therapie auf das RFS ($p<0,001$). ...	59
Abb. 18: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Therapie auf das PFS ($p<0,001$).	60
Abb. 19: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Therapie auf das CSS ($p<0,001$).	60
Abb. 20: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses des Gradings nach WHO2004/2016 auf das RFS ($p=0,030$).	61
Abb. 21: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit G3 Tumor und der Auswirkung der AQP9-mRNA- Expression auf das PFS (cut-off: Median; $p=0,029$).	63
Abb. 22: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit G3 Tumor und der Auswirkung der AQP7-mRNA- Expression auf das CSS (cut-off: Median; $p=0,036$).	64
Abb. 23: Verteilung der ΔCq Werte der AQP3-mRNA-Expression.....	68
Abb. 24: Verteilung der ΔCq Werte der AQP4-mRNA-Expression.....	68
Abb. 25: Verteilung der ΔCq Werte der AQP7-mRNA-Expression.....	69
Abb. 26: Verteilung der ΔCq Werte der AQP9-mRNA-Expression.....	69
Abb. 27: Balkendiagramm zum Ausmaß der Korrelation zwischen den Aquaporinen und klinischen und pathologischen Parametern. Dargestellt sind lediglich statistisch signifikante Korrelationen.	71
Abb. 28: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung des Gradings nach WHO2004/2016 auf das RFS ($p=0,015$).	77
Abb. 29: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung der Fokalität auf das RFS ($p=0,010$).	78
Abb. 30: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung der Fokalität auf das PFS ($p=0,006$).	78
Abb. 31: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie und der Auswirkung der Fokalität auf das CSS ($p=0,021$).	79
Abb. 32: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie, mit BCG Instillationstherapie und der Auswirkung der AQP3-mRNA-Expression auf das CSS (cut-off: Median; $p=0,022$).	81

Abb. 33: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie mit G3 Tumoren und der Auswirkung der AQP7-mRNA-Expression auf das PFS (cut-off: Median; p=0,045).	82
Abb.34: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie, mit G3 Tumoren und der Auswirkung der AQP9-mRNA-Expression auf das PFS (cut-off: Median; p=0,038).	83
Abb. 35: Kaplan-Meier-Analyse der Patienten ohne Frühzystektomie, mit Tumoren größer/gleich 3 cm und der Auswirkung der AQP3-mRNA-Expression auf das CSS (cut-off: Median; p=0,036).....	85

7 Literaturverzeichnis

- 1) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Bray F, u.a. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25220842.
- 2) Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015 ISBN:978-3-89606-228-4 DOI:10.17886/rkipubl-2015-004 http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf
Seite 18 Kapitel 3.0: Übersichten zu den Krebsneuerkrankungs- und Krebssterbefällen
- 3) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 22 Kapitel 2.Einführung 2.1.Geltungsbereich und Zweck
- 4) Hong YM, Loughlin KR. Economic impact of tumor markers in bladder cancer surveillance. *Urology*. 2008 Jan;71(1):131-5. doi: 10.1016/j.urology.2007.08.014. PMID: 18242381.
- 5) Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Zigeuner R, u.a. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder:

Update 2016. Eur Urol. 2017 Mar;71(3):447-461. doi:
10.1016/j.eururo.2016.05.041. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27324428.
page 8 chapter 3.1: Epidemiology

- 6) Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015 ISBN:978-3-89606-228-4 DOI:10.17886/rkipubl-2015-004 http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf
Seite 106 ff Kapitel 3.22: Harnblase
- 7) Lampert T. Rauchen – Aktuelle Entwicklungen bei Erwachsenen. GBE Kompakt - Zahlen und Trends aus der Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2011;2(4):1–9. Seite 6 Tabelle 1
- 8) Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015 ISBN:978-3-89606-228-4 DOI:10.17886/rkipubl-2015-004 http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf
Seite 108 Abbildung 3.22.3: Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht
- 9) Dorp F., Schmid K.W., Rübben H. Uroonkologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg [Internet]. 2001;5:303. Verfügbar unter: http://www.forschungsverbund-blasenkarzinom.de/hintergrund_hbk.pdf
Seite 306 Kapitel 19.2: Onkologische Kennzeichen (Definition von Tumorentitäten)
- 10) Helpap V.B., Knüchel-Clarke R., Hartmann A. Anleitung zur pathologisch-anatomischen Diagnostik von Tumoren des Nierenbeckens, des Ureters und der Harnblase des Bundesverbandes Deutscher Pathologen e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. 2. Auflage, 2012 - Seite 14: Allgemeine Erläuterungen zum Grading
- 11) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 61 Kapitel 4. Tumorklassifikation 4.1. Einleitung und neue

WHO-Klassifikation 2016 - Tabelle 14: TNM-Klassifikation – Urothelkarzinom der Harnblase

- 12) Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Kurth K, u.a. 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.* 2006 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7. doi: 10.1016/j.eururo.2005.12.031. Epub 2006 Jan 17. PMID: 16442208.
- 13) Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Kurth K, u.a. 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.* 2006 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7. doi: 10.1016/j.eururo.2005.12.031. Epub 2006 Jan 17. PMID: 16442208.
Seite 470 Kapitel 3.4 Time to progression –Tabelle 5: Weights used to calculate the recurrence and progression scores
- 14) Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, 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.* 2006 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7. doi: 10.1016/j.eururo.2005.12.031. Epub 2006 Jan 17. PMID: 16442208.
Seite 471 Kapitel 3.4 Time to progression –Tabelle 6: Probability of recurrence and progression according to total score
- 15) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 286 – Kapitel 3.2.1.2: Stratifizierung nach genetischer Prädisposition - Tabelle 39: Übersicht konsensbasierte Definition der Risikogruppen des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms
- 16) Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015 ISBN:978-3-89606-228-4 DOI:10.17886/rkipubl-2015-004

http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf

Seite 108 Tabelle 3.22.2: Erkrankungs- und Sterberisiko in Deutschland nach Alter und Geschlecht

- 17) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 34 Kapitel 3.2.1.2: Stratifizierung nach genetischer Prädisposition
- 18) Skeldon SC, Semotiuk K, Aronson M, Holter S, Gallinger S, Zlotta AR u.a. Patients with Lynch syndrome mismatch repair gene mutations are at higher risk for not only upper tract urothelial cancer but also bladder cancer. Eur Urol, 2013 Feb;63(2):379-85. doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.047. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22883484.
- 19) Rehn L. Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. (1895) Archiv für Klinische Chirurgie Band 50. Verlag von August Hirschwald: Seite 588-600
- 20) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 36 Kapitel 3.2.1.3: Stratifizierung nach unterschiedlichen Karzinogenen 3.6. Konsensbasiertes Statement
- 21) Vineis P, Pirastu R. Aromatic amines and cancer. Cancer Causes and Control. 1997 May;8(3):346-55. doi: 10.1023/a:1018453104303. PMID: 9498898.
- 22) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 47 ff Kapitel 3.2.2: Anerkennung von Risikofaktoren durch die Unfallversicherungsträger
- 23) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

- eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH).
2016;371.Seite 41 Kapitel: 3.2.1.4 Stratifizierung nach Rauchen von Zigaretten
- 24) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. Bd. 100, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2012. S. 1–538.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100E/mono100E.pdf>
- 25) Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Boffetta P, u.a. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*. 2000 Apr 15;86(2):289-94. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(20000415)86:2<289::aid-ijc21>3.0.co;2-m. PMID: 10738259.
- 26) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371.Seite 43 Kapitel 3.2.1.5: Stratifizierung nach entzündlichen Erkrankungen der Harnblase 3.8.Konsensbasiertes Statement
- 27) Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF Jr, u.a. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol*. 1984 Apr;119(4):510-5. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113768. PMID: 6711540.
- 28) Boice JD Jr, Day NE, Andersen A, Brinton LA, Brown R, Flannery JT, u.a. Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. An international collaboration among cancer registries. *J Natl Cancer Inst*. 1985 May;74(5):955-75. PMID: 3858584.
- 29) Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES, Chen BE, Storm H, Travis LB,u.a. Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Nov 7;99(21):1634-43. doi: 10.1093/jnci/djm201. Epub 2007 Oct 30. PMID: 17971527.
- 30) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

- eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH).
2016;371. Seite 76 Kapitel 5: Diagnostik und Stadieneinteilung /5.1 Einführung
- 31) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH).
2016;371. Seite 86 ff Guidelines Kapitel 5.3: Primärdiagnostik des Harnblasenkarzinoms
- 32) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH).
2016;371. Seite 79 Guidelines Kapitel 5.2.1.2: Urinzytologie
- 33) Raisi O, Magnani C, Bigiani N, Cianciavichia E, D'Amico R, Muscatello U, u. a. The diagnostic reliability of urinary cytology: A retrospective study. *Diagn Cytopathol.* 2012;40(7):608–14. DOI 10.1002/dc
- 34) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 92 Kapitel 5.6: Bildgebende Diagnostik beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom
- 35) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 96 Kapitel 6: Therapie des nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms 6.1. Technik der transurethralen Blasentumorresektion
- 36) Mowatt G, N'Dow J, Vale L, Nabi G, Boachie C, Griffiths TR, u.a.; Aberdeen Technology Assessment Review (TAR) Group. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and

- meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care*. 2011 Jan;27(1):3-10. doi: 10.1017/S0266462310001364. Epub 2011 Jan 25. PMID: 21262078.
- 37) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 110 Hintergrund zu 6.16
- 38) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 108 Einleitung
- 39) Schips L, Augustin H, Zigeuner RE, Gallé G, Habermann H, Hubner G, u.a. Is repeated transurethral resection justified in patients with newly diagnosed superficial bladder cancer? *Urology*. 2002 Feb;59(2):220- 3. doi: 10.1016/s0090-4295(01)01522-9. PMID: 11834389.
- 40) Zurkirchen MA, Sulser T, Gaspert A, Hauri D. Second transurethral resection of superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a must even for experienced urologists. *Urol Int*. 2004;72(2):99-102. doi: 10.1159/000075961. PMID: 14963348.
- 41) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371.6.3. Seite 107 6.15: Evidenzbasierte Empfehlung
- 42) Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2004 Jun;171(6 Pt 1):2186-90, quiz 2435. doi: 10.1097/01.ju.0000125486.92260.b2. PMID: 15126782.
- 43) Gudjónsson S, Adell L, Merdasa F, Olsson R, Larsson B, Liedberg F, u.a. Should all patients with non-muscle-invasive bladder cancer receive early intravesical chemotherapy after transurethral resection? The results of a

- prospective randomised multicentre study. Eur Urol. 2009 Apr;55(4):773-80. doi: 10.1016/j.eururo.2009.01.006. Epub 2009 Jan 13. PMID: 19153001.
- 44) Solsona E, Iborra I, Ricós JV, Monrós JL, Casanova J, Dumont R, u.a. Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term followup. J Urol. 1999 Apr;161(4):1120-3. PMID: 10081851.
- 45) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 112 Kapitel 6.4: Postoperative Chemotherapie-Frühinstitution nach TUR-Blasenresektion – Kommentar: Einfluss der Frühinstitution auf die Progression und nachfolgender Frühinstitutionen
- 46) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 113 Hintergrund zu 6.20
- 47) Witjes JA, Hendricksen K. Intravesical pharmacotherapy for non-muscle-invasive bladder cancer: a critical analysis of currently available drugs, treatment schedules, and long-term results. Eur Urol. 2008 Jan;53(1):45-52. doi: 10.1016/j.eururo.2007.08.015. Epub 2007 Aug 20. PMID: 17719169.
- 48) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 113 Kapitel 6.5.1: Einfluss der adjuvanten intravesikalen Instillationsbehandlung beim low-risk Tumor nach EORTC.
- 49) Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Witjes JA. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol. 2009 Aug;56(2):247-56. doi: 10.1016/j.eururo.2009.04.038. Epub 2009 Apr 24. PMID: 19409692.

- 50) Han KS, You D, Jeong IG, Kwon T, Hong B, Kim CS, u.a.
Is intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy superior to chemotherapy for intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer? An ongoing debate. *J Korean Med Sci.* 2015 Mar;30(3):252-8. doi: 10.3346/jkms.2015.30.3.252. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25729246; PMCID: PMC4330478.
- 51) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 115 Kapitel 6.5.2: Einsatz der adjuvanten Instillationstherapie bei intermediate- risk Tumoren nach EORTC
- 52) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 118 Kapitel 6.6: Einfluss der verschiedenen adjuvanten BCG-Instillations-Schemata auf die Rezidiv- und Progressionsrate
- 53) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 124 Kapitel 6.8: Diagnostik und Therapie beim isolierten Carcinoma in situ der Harnblase
- 54) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 136 Kapitel 6.10: Alternativtherapien bei Hochrisiko nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom
- 55) Denzinger S, Fritsche HM, Otto W, Blana A, Wieland WF, Burger M. Early versus deferred cystectomy for initial high-risk pT1G3 urothelial carcinoma of the bladder: do risk factors define feasibility of bladder-sparing approach? *Eur*

- Urol. 2008 Jan;53(1):146-52. doi: 10.1016/j.eururo.2007.06.030.
Epub 2007 Jun 27. PMID: 17624657.
- 56) Badalato GM, Gaya JM, Hruby G, Patel T, Kates M, McKiernan JM,u.a.
Immediate radical cystectomy vs conservative management for high grade
cT1 bladder cancer: is there a survival difference? BJU Int. 2012
Nov;110(10):1471-7. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11116.x. Epub 2012 Apr
4. PMID: 22487512.
- 57) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des
Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der
Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH).
2016;371.Seite 287 Kapitel 11.1.3: Risikoadaptierte Nachsorge des NMIBC
- 58) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des
Harnblasenkarzinoms. Langversion 1.0 Leitlinienprogr Onkol der
Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). –
September 2016;371. Seite 147 f Kapitel 7.2: Radikale Zystektomie bei
Harnblasenkarzinompatienten
- 59) Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Skinner DH u.a.
Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term
Results in 1054 Patients. Bd. 19, J Clin Oncol. 2001. S. 666–75.
- 60) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des
Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der
Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH).
2016;371. Seite 212 Kapitel 9: Neoadjuvante/adjuvante Therapie und palliative
Chemotherapie
- 61) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des
Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der
Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH).
2016;371. Seite 213 Kapitel 9.1: Neoadjuvante Chemotherapie beim
lokalisierten muskelinvasiven Harnblasenkarzinom

- 62) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 218 Kapitel 9.2: Adjuvante Chemotherapie
- 63) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 185 Kapitel 7.8: Transurethrale Resektion gefolgt von Radiochemotherapie als Alternative zur radikalen Zystektomie bei Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase
- 64) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 194 Kapitel 7.11. Durchführung des Re-Stagings nach Radiotherapie/Radiochemotherapie
- 65) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371. Seite 67 Kapitel 4.2.6: Molekulare Prognosemarker des Urothelkarzinoms
- 66) Agre P. The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(1):5-13. doi: 10.1513/pats.200510-109JH. PMID: 16493146; PMCID: PMC2658677.
- 67) Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N, Kienle MG, u.a. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics.* 2006 Oct;6(20):5637- 49. doi: 10.1002/pmic.200600212. PMID: 17044001.
- 68) Heymann JB, Engel A. Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News Physiol Sci.* 1999 Oct;14:187-193. doi: 10.1152/physiologyonline.1999.14.5.187. PMID: 11390849.

- 69) Rubenwolf PC, Denzinger S, Otto W. Aquaporin 3 protein expression in transitional cell carcinoma: a potential marker with regard to tumour progression and prognosis? *Eur Urol.* 2012 Mar;61(3):627-8. doi: 10.1016/j.eururo.2011.12.023. Epub 2011 Dec 21. PMID: 22197473.
- 70) Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 2003 Nov 27;555(1):72-8. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01083-4. PMID: 14630322.
- 71) King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, Agre P. Defective urinary concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med.* 2001 Jul 19;345(3):175-9. doi: 10.1056/NEJM200107193450304. PMID: 11463012.
- 72) Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Oost BA, u.a. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science.* 1994 Apr 1;264(5155):92-5. doi: 10.1126/science.8140421. PMID: 8140421.
- 73) Roudier N, Ripoche P, Gane P, Le Pennec PY, Daniels G, Bailly P, u.a. AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29;277(48):45854-9. doi: 10.1074/jbc.M208999200. Epub 2002 Sep 17. PMID: 12239222.
- 74) Verkman AS, Hara-Chikuma M, Papadopoulos MC. Aquaporins-new players in cancer biology. *J Mol Med (Berl).* 2008 May;86(5):523-9. doi: 10.1007/s00109-008-0303-9. Epub 2008 Mar 1. PMID: 18311471; PMCID: PMC3590015.
- 75) Moon C, Soria JC, Jang SJ, Lee J, Obaidul Hoque M, Mao L, u.a. Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene.* 2003 Oct 2;22(43):6699-703. doi: 10.1038/sj.onc.1206762. PMID: 14555983.
- 76) Ding T, Ma Y, Li W, Liu X, Ying G, Gu F, u.a. Role of aquaporin-4 in the regulation of migration and invasion of human glioma cells. *Int J Oncol.* 2011 Jun;38(6):1521-31. doi: 10.3892/ijo.2011.983. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21424125.
- 77) Li YB, Sun SR, Han XH. Down-regulation of AQP4 Inhibits Proliferation, Migration and Invasion of Human Breast Cancer Cells. *Folia Biol (Praha).* 2016;62(3):131-7. PMID: 27516192.

- 78) Zhu Z, Jiao L, Li T, Wang H, Wei W, Qian H, u.a. Expression of AQP3 and AQP5 as a prognostic marker in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett.* 2018 Aug;16(2):2661-2667. doi: 10.3892/ol.2018.8955. Epub 2018 Jun 12. PMID: 30013662; PMCID: PMC6036574.
- 79) Thapa S, Chetry M, Huang K, Peng Y, Wang J, Ji K, u.a. Significance of aquaporins' expression in the prognosis of gastric cancer. *Biosci Rep.* 2018 Jun 12;38(3):BSR20171687. doi: 10.1042/BSR20171687. PMID: 29678898; PMCID: PMC5997799.
- 80) Rubenwolf PC, Georgopoulos NT, Clements LA, Feather S, Holland P, Southgate J, u.a. Expression and localisation of aquaporin water channels in human urothelium in situ and in vitro. *Eur Urol.* 2009 Dec;56(6):1013-23. doi: 10.1016/j.eururo.2008.08.013. Epub 2008 Aug 13. PMID: 18718702.
- 81) Otto W, Rubenwolf PC, Burger M, Fritsche HM, Rößler W, Denzinger S, u.a. Loss of aquaporin 3 protein expression constitutes an independent prognostic factor for progression-free survival: an immunohistochemical study on stage pT1 urothelial bladder cancer. *BMC Cancer.* 2012 Oct 8;12:459. doi: 10.1186/1471-2407-12-459. PMID: 23043286; PMCID: PMC3517507.
- 82) Rubenwolf P, Thomas C, Denzinger S, Hartmann A, Burger M, Otto W, u.a. Loss of AQP3 protein expression is associated with worse progression-free and cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol.* 2015 Dec;33(12):1959-64. doi: 10.1007/s00345-015-1574-8. Epub 2015 May 5. PMID: 25939538.
- 83) Breyer J, Otto W, Burger M, Hartmann A, Rubenwolf PC. Aquaporin 3 Expression Loss in Urothelial Carcinoma: Association with Tumor Invasion Depth, but not with Grading? *Bladder Cancer.* 2017 Jan 27;3(1):31-34. doi: 10.3233/BLC-160082. PMID: 28149932; PMCID: PMC5271480.
- 84) Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol.* 2013;530:67-74. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6. PMID: 24034314.
- 85) Breyer J, Wirtz RM, Erben P, Worst TS, Stoehr R, Otto W, u.a; Bladder Cancer Research Initiative for Drug Targets Germany (BRIDGE) Consortium eV, Mannheim, Germany. High CDKN2A/p16 and Low FGFR3 Expression Predict Progressive Potential of Stage pT1 Urothelial Bladder Carcinoma. *Clin*

- Genitourin Cancer. 2018 Aug;16(4):248-256.e2. doi: 10.1016/j.clgc.2018.01.009. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29525349.
- 86) Dorp F., Schmid K.W., Rübber H. Uroonkologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg [Internet]. 2001;5:303. Verfügbar unter: http://www.forschungsverbund-blasenkarzinom.de/hintergrund_hbk.pdf Seite 309 Hintergrund Kapitel 19.2.2 Histopathologisches Grading
- 87) Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Zigeuner R, u.a. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. Eur Urol. 2017 Mar;71(3):447-461. doi: 10.1016/j.eururo.2016.05.041. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27324428. page 19 - 6.4 Subgroup of highest-risk tumours Table 6.3: Risk group stratification Risk.
- 88) S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0. Leitlinienprogr Onkol der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Dtsch Krebsgesellschaft eV und Dtsch Krebshilfe (DKH). 2016;371.Seite 136 Kapitel 6.10: Alternativtherapien bei Hochrisiko nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom
- 89) Shabsigh A, Korets R, Vora KC, Brooks CM, Cronin AM, Donat SM, u.a. Defining early morbidity of radical cystectomy for patients with bladder cancer using a standardized reporting methodology. Eur Urol. 2009 Jan;55(1):164-74. doi: 10.1016/j.eururo.2008.07.031. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18675501.
- 90) Aziz A, May M, Burger M, Palisaar RJ, Trinh QD, Roghmann F,u.a; Prometrics 2011 research group. Prediction of 90-day mortality after radical cystectomy for bladder cancer in a prospective European multicenter cohort. Eur Urol. 2014 Jul;66(1):156-63. doi: 10.1016/j.eururo.2013.12.018. Epub 2013 Dec 27. PMID: 24388438.
- 91) Breyer J, Wirtz RM, Otto W, Laible M, Schlombs K, Hartmann A,u.a. Predictive value of molecular subtyping in NMIBC by RT-qPCR of ERBB2, ESR1, PGR and MKI67 from formalin fixed TUR biopsies. Oncotarget. 2017 Jun 28;8(40):67684-67695. doi: 10.18632/oncotarget.18804. PMID: 28978063; PMCID: PMC5620203.

- 92) Vetterlein MW, Gild P, Marks P, Roschinski J, Doh O, Rink M, u.a. Evaluating Guideline Adherence for T1 Bladder Cancer Treatment and Surveillance: A Retrospective German Multicenter Observation. *Urol Int.* 2018;101(3):285-292. doi: 10.1159/000493369. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30235462.
Tabelle 1 Seite 287
- 93) Bründl J, Wallinger S, Breyer J, Weber F, Evert M, Rubenwolf P,u.a. Expression, localisation and potential significance of aquaporins in benign and malignant human prostate tissue. *BMC Urol.* 2018 Sep 3;18(1):75. doi: 10.1186/s12894-018-0391-y. PMID: 30176851; PMCID: PMC6122723.

8 Publikationen

8.1 Kongressbeiträge

Sonja Herdegen, Wolfgang Otto, Philipp Julian Spachmann, **Sebastian Kälble**, Ralph Markus Wirtz, Sabine Wallinger, Matthias Evert, Florian Weber, Stefan Denzinger, Maximilian Burger, Johannes Breyer.

Aquaporin-Expression korreliert mit adversen klinischen und pathologischen Faktoren beim pT1 Urothelkarzinom der Harnblase.

44. Gemeinsame Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Urologie und Andrologie und der Bayerischen Urologenvereinigung, Rosenheim, 15.06.2018

Sonja Herdegen, **Sebastian Kälble**, Wolfgang Otto, Philipp Julian Spachmann, Ralph Markus Wirtz, Sabine Wallinger, Johannes Bründl, Matthias Evert, Florian Weber, Stefan Denzinger, Maximilian Burger, Johannes Breyer.

Aquaporin-Überexpression identifiziert beim pT1 Urothelkarzinom der Harnblase Hochrisikopatienten mit einem schlechteren Outcome.

70. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie Dresden, 26-29.09.2018

8.2 Paper

Julian Reiß, **Sebastian Kälble**, Johannes Bründl, Bernd Rosenhammer, Michael Gierth, Florian Weber, Markus Eckstein, Ralph Markus Wirtz, Stefan Denzinger, Maximilian Burger, Wolfgang Otto, Johannes Breyer.

Prognostic role of mRNA-expression of aquaporins (AQP) 3,4,7 and 9 in stage T1 non-muscle-invasive bladder cancer. *Bladder Cancer*, accepted 25.11.2020

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Burger, Direktor der Klinik für Urologie am Caritas Krankenhaus St. Josef in Regensburg, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Doz. Dr. Johannes Breyer für seine hervorragende Betreuung. Ich konnte mich mit jeder Frage an ihn wenden und bekam in kürzester Zeit eine konstruktive Antwort. Auch hat er die Arbeit mehrmals wohlwollend korrigiert, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Die Messung der AQP-mRNA-Expression erfolgte im Labor H4 auf dem Campus des Universitätsklinikums Regensburg mit Unterstützung durch die medizintechnische Angestellte Stefanie Götz. Für ihre Einarbeitung in die Methodik und Beantwortung zahlreicher Fragen danke ich ihr sehr. Herzlichen Dank auch an den Laborleiter Prof. Dr.med. Otto.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern, die mich stets wohlwollend begleiten und unterstützen.

10 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Sebastian Kälble
Regensburg 2021

11 Lebenslauf

Name: Sebastian Kälble
Anschrift: Fröhliche-Türken-Straße 4
93047 Regensburg
E-Mail: sebastian.kaelble@web.de
Geburtsort: Heidelberg
Geburtsdatum: 16.05.1993
Konfession: römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

07/1999 – 06/2003 Grundschule in Fulda
07/2003 – 06/2012 Rabanus-Maurus-Schule (Domgymnasium) Fulda
09/2009 – 07/2010 Boarding School „The Leys School“, Cambridge
06/2012 Allgemeine Hochschulreife

Bundesfreiwilligendienst

01.09 2012 – 31.08 2013 Bundesfreiwilligendienst als Rettungshelfer beim
Rettungsdienst der Malteser in Fulda
07/ 2016 Abschlussprüfung zum Rettungssanitäter

Studium

10/2013 – 06/2020 Studium der Humanmedizin an der Universität
Regensburg
19.08.2015 1.Staatsexamen - schriftlicher Teil
03.09.2015 1.Staatsexamen - mündlicher Teil
09. – 11.04.2019 2.Staatsexamen - schriftlicher Teil
28.05.2020 3.Staatsexamen - mündlicher Teil

18.06.2020	Erhalt der Approbation
05/2019 – 04/2020	Praktisches Jahr in Regensburg, Newcastle und Bozen

Praktika

Pflegepraktika

06.06.2012 – 05.07.2012	Pflegepraktikum in der Medizinischen Klinik III des Klinikums Fulda
26.08.2013 – 24.09.2013	Pflegepraktikum in der Klinik für Unfallchirurgie des Klinikums Fulda
04.08.2014 – 19.08.2014	Pflegepraktikum in der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Klinikums Fulda

Famulaturen

07.03.2016 – 08.04.2016	Urologie und Kinderurologie, Klinikum Fulda.
05.09.2016 – 04.10.2016	Hausärztliche Famulatur bei der Bundespolizei in Bad Bergzabern.
21.08.2017 – 19.09.2017	Klinik für Allgemein -und Viszeralchirurgie, Klinikum Fulda.
05.03.2018 – 03.04.2018	Notaufnahme im Bugando Medical Centre in Mwanza, Tanzania.

Beruflicher Werdegang

Seit 01.10.2020:	Assistenzarzt in der Klinik für Urologie im Caritas-Krankenhaus St.Josef. Lehrstuhl für Urologie der Universität Regensburg.
------------------	---

Auszeichnung

09/2019:	Förderprogramm „Die besten für die Urologie“.
----------	---

Nebentätigkeiten

07/2016 – 08/2019:	Stadtführer bei Regensburg Aktiv
04/2014 – 09/2018:	Mitglied bei Migrantenmedizin Regensburg
2018 und 2019:	Teilnahme an Registrierungsaktionen der DKMS

Kenntnisse & Fähigkeiten

Fremdsprachen:	Englisch fließend in Wort und Schrift Englischprüfung IELTS (International English Language Testing System) Ergebnis: 7,5/9,0 Grundkenntnisse in Spanisch und Französisch
EDV Kenntnisse:	Microsoft Office (Word, Excel, Power Point)
Führerschein:	Klasse B und C1
Sonstiges:	Sprechfunkausbildung im Analog- und Digitalfunk