

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD DR. MICHAEL GIERTH
UROLOGIE

IMMUNHISTOCHEMISCHE BESCHREIBUNG DER EMT-MARKER-EXPRESSION
UND DEREN EINFLUSS AUF DEN ONKOLOGISCHEN VERLAUF VON
PATIENTEN MIT UROTHEL-KARZINOM DER HARNBLASE NACH RADIKALER
ZYSTEKTOMIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Böer

2022

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD DR. MICHAEL GIERTH
UROLOGIE

IMMUNHISTOCHEMISCHE BESCHREIBUNG DER EMT-MARKER-EXPRESSION
UND DEREN EINFLUSS AUF DEN ONKOLOGISCHEN VERLAUF VON
PATIENTEN MIT UROTHEL-KARZINOM DER HARNBLASE NACH RADIKALER
ZYSTEKTOMIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Böer

2022

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

PD Dr. Michael Gierth

2. Berichterstatter:

PD Dr. Stephan Seitz

Tag der mündlichen Prüfung:

12. Oktober 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Mikroskopische Anatomie der Harnblase	5
1.2	Das Harnblasenkarzinom	6
1.2.1	Epidemiologie	6
1.2.2	Ätiopathogenese	9
1.2.3	TNM-Stadium und WHO-Klassifikation.....	11
1.3	EMT	15
1.4	Stellenwert der immunhistochemischen Marker	18
1.4.1	Zellkontakte und die Rolle von Cadherinen und Cateninen	18
1.4.2	Rolle von TIMP1 und FGFR3	20
1.5	Ziel der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Patienten.....	24
2.1.1	Patientenkollektiv	24
2.1.2	Patientenmaterial	26
2.2	Herstellung der Paraffinschnitte	26
2.3	Herstellung der HE-Färbung.....	27
2.4	Herstellung der immunhistochemischen Färbung.....	27
2.5	Histologische Begutachtung, Datendokumentation und statistische Auswertung....	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Patientenkollektiv	32
3.1.1	Deskriptive Patientencharakteristik und Follow Up	32
3.1.2	Auswirkungen klinischer und histopathologischer Parameter auf das krebsspezifische Überleben (CSS).....	35
3.2	E-Cadherin.....	47
3.2.1	Deskriptive Expressionsanalyse	47
3.2.2	Auswirkung der E-Cadherin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS).....	50
3.3	N-Cadherin.....	56
3.3.1	Deskriptive Expressionsanalyse	56
3.3.2	Auswirkung der N-Cadherin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS).....	59
3.4	β-Catenin	64

3.4.1	Deskriptive Expressionsanalyse	64
3.4.2	Auswirkung der β -Catenin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)	67
3.5	γ -Catenin	71
3.5.1	Deskriptive Expressionsanalyse	71
3.5.2	Auswirkung der γ -Catenin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)	75
3.6	TIMP1	79
3.6.1	Deskriptive Expressionsanalyse	79
3.6.2	Auswirkung der TIMP1-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS).	82
3.7	FGFR3	87
3.7.1	Deskriptive Expressionsanalyse	87
3.7.2	Auswirkung der FGFR3-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)	92
4	Diskussion	96
4.1	Klinische und histopathologische Parameter des Patientenkollektivs	96
4.2	E-Cadherin	99
4.3	N-Cadherin	100
4.4	β -Catenin	101
4.5	γ -Catenin	102
4.6	TIMP1	103
4.7	FGFR3	105
5	Zusammenfassung	106
6	Anhang	110
6.1	Abbildungsverzeichnis	110
6.2	Tabellenverzeichnis	114
6.3	Abkürzungsverzeichnis	115
7	Literaturverzeichnis	116
8	Danksagung	
9	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Mikroskopische Anatomie der Harnblase

Das Übergangsepithel oder Urothel bildet in den ableitenden Harnwegen das spezifische Deck- oder Oberflächenepithel. In der entleerten Harnblase besteht es aus 6-7 Zellschichten - füllt sich die Blase, sind weniger Schichten zu erkennen. Grundlage des Urothels bildet die Basalmembran mit einer basalen Zellschicht, auf die sich eine Intermediärschicht und schließlich eine Deckschicht mit apikaler Crusta anschließt. Die Deckschicht besteht aus den sogenannten „umbrella cells“ oder Superfizialzellen, die oftmals poly- oder diploid sind. Diese sind größer als die darunterliegenden Intermediärzellen und decken mehrere Intermediärzellen schirmartig ab (1). Die Crusta urothelialis beschreibt eine Verdichtung der Zytokeratinfilamente im apikalen Zytoplasma der Deckzellen, die im Lichtmikroskop als stärker angefärbter Bereich zu erkennen ist. Die betonte Anfärbbarkeit ist zusätzlich bedingt durch den lokalen Gehalt an diskoiden Vesikeln, die Uroplakine enthalten, welche normalerweise als spezifische Transmembranproteine in die apikale Membran der urothelialen Deckzellen eingelagert sind – durch den Mechanismus der Exozytose können die Uroplakine in den flachen Vesikeln bei Bedarf vermehrt in die apikale Membran eingebaut werden und so wahrscheinlich bei Dehnung der Blase die Oberfläche der Deckzellen vergrößern. Möglicherweise nutzt das Einfügen neuer Vesikel auch der Membranerneuerung (2). Des Weiteren dienen Uroplakine der mechanischen und chemischen Widerstandsfähigkeit der apikalen Membran. Zusammen mit Verschlusskontakten (Tight junctions) sind sie verantwortlich für die Permeabilitätsschranke des Urothels gegenüber dem Harn. Das Urothel wird in der Literatur teils als mehrreihiges, teils als mehrschichtiges Epithel beschrieben: scheinbar haben zwar alle intermediär und basal gelegenen Zellen Kontakt mit der Basalmembran, allerdings müssten bei einem mehrreihigen Epithel per Definition auch alle Deckzellen die Basalmembran erreichen; ob diese mit einem dünnen Ausläufer die Basallamina berühren, ist noch nicht abschließend geklärt (1–3). Unterhalb des Urothels liegt in der Harnblase die bindegewebige Lamina propria mit dichtem Kapillarplexus und der Lamina muscularis mucosae, die allerdings im Lichtmikroskop nicht immer zu erkennen ist. Urothel, Lamina propria

und Lamina muscularis mucosae bilden zusammen die Tunica Mucosa. Diese ist in entleertem Zustand faltig aufgeworfen - dehnt sich die Harnblase, wird eine Oberflächenvergrößerung durch Verstreichen dieser Falten erreicht. Zudem vergrößert sich die Oberfläche durch Änderung von Form und Anordnung der Intermediärzellen des Urothels und durch Glättung gröberer Unebenheiten in der apikalen Deckzellenschicht. Unterhalb der Mucosa befindet sich die Submucosa, gefolgt von der Tunica muscularis aus glatter Muskulatur, die dem Musculus detrusor vesicae entspricht. Die bindegewebige Adventitia bettet die Harnblase in das umliegende Gewebe ein, in einigen Bereichen bildet aber auch statt dessen die Tunica serosa aus einschichtigem Plattenepithel zusammen mit der Tela subserosa den Überzug der Harnblase (2).

1.2 Das Harnblasenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste Tumorentität des Urogenitaltrakts (4). Laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten ZfKD des Robert-Koch-Instituts in Berlin steht es in Deutschland im Jahr 2016 bei Männern nach Prostata-, Lungen- und Darmkrebs an vierter Stelle der häufigsten Tumorlokalisationen mit anteilig 4,7% an allen Krebsneuerkrankungen. Bei Frauen steht es mit anteilig 1,8% an vierzehnter Stelle (siehe Abbildung 1):

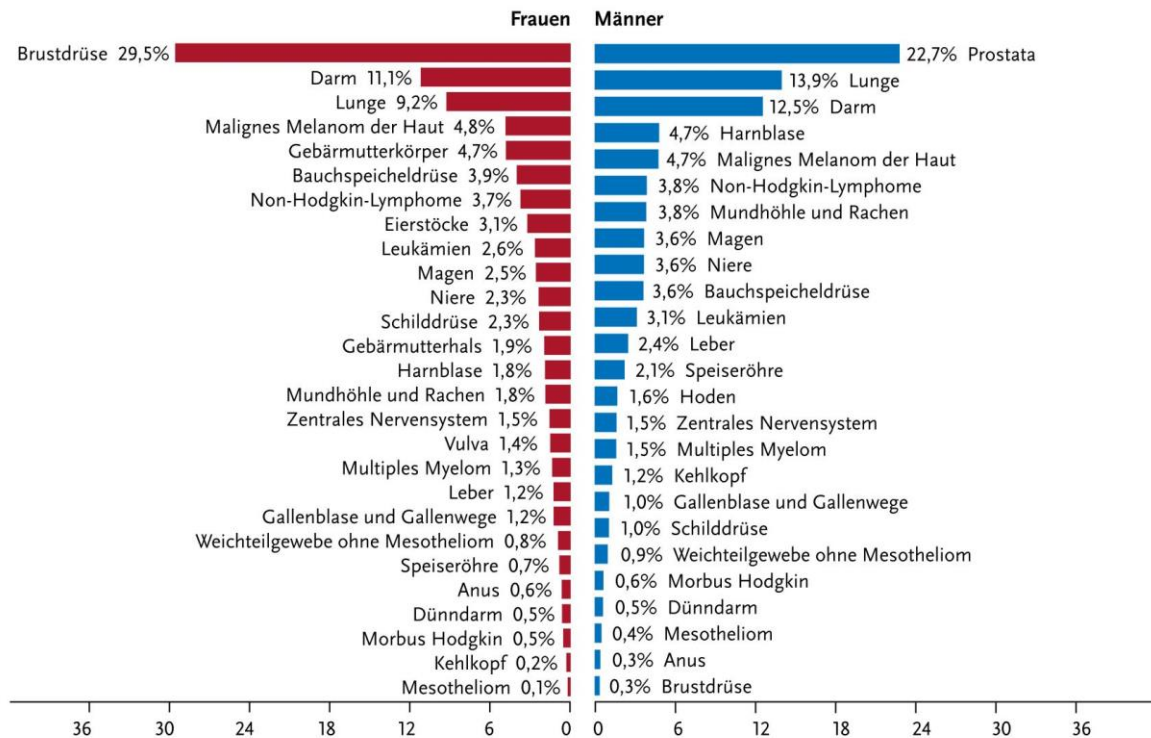


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (5)

Bezogen auf alle Krebssterbefälle in Deutschland steht das Harnblasenkarzinom bei Männern an zehnter (mit 3,2%) und bei Frauen an fünfzehnter Stelle (mit 1,8%) der häufigsten Tumorlokalisationen (siehe Abbildung 2):

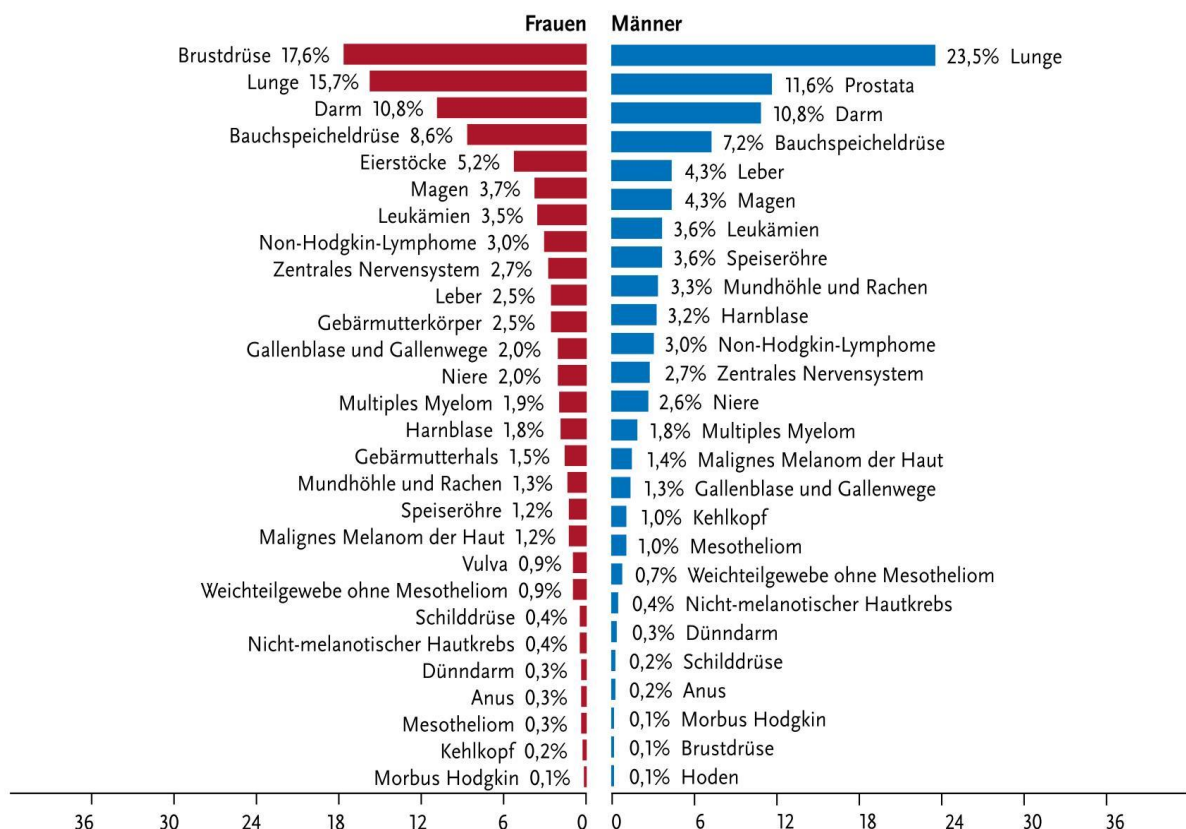


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016 (5)

Insgesamt ist die Inzidenz der Harnblasenkarzinome in den letzten Jahren steigend. Im Jahr 2016 betrug sie 73,3 pro 100.000 Einwohner (inklusive in-situ Tumoren und Neubildungen unsicheren oder unbekannten Verhaltens) entsprechend in etwa 29.970 Menschen. Knapp ein Drittel dieser Betroffenen waren Frauen (5).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate bösartiger Neubildungen der Harnblase, die speziell die krebisbedingte Mortalität widerspiegelt, liegt bei Männern bei ca. 58% und bei Frauen bei ca. 48%. Die bessere Überlebensrate bei männlichen Patienten korreliert hierbei mit einer günstigeren Verteilung der Tumorstadien bei Männern gegenüber Frauen: 36% (bei ♂) gegenüber 24% (bei ♀) betreffend Stadium UICC I und 24% (♂) gegenüber 30% (♀) betreffend UICC IV. Das Harnblasenkarzinom tritt außerdem bevorzugt in höherem Lebensalter auf. Das mittlere Erkrankungsalter (median) liegt beim Mann bei 74 und bei der Frau bei 76 Jahren. Die Morbidität steigt ab dem 45. Lebensjahr stetig an (5).

Insgesamt sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten bei männlichen Patienten seit 1990 rückläufig, bei weiblichen Patienten blieben sie hingegen weitgehend konstant. Ursächlich für diesen Rückgang sei vermutlich mitunter die Verminderung des Tabakkonsums oder auch die in den letzten Jahren stetig abnehmende berufsbedingte Exposition gegenüber Karzinogenen. Der sinkenden Erkrankungs- und Sterberate bei Männern steht scheinbar widersprüchlich die steigende Inzidenz gegenüber, die sich aber durch die demographische Entwicklung mit einem zunehmenden Anteil der älteren Bevölkerung erklären lässt (3,5).

1.2.2 Ätiopathogenese

Harnblasenkarzinome treten gehäuft an der Blasenseiten- bzw. -hinterwand auf und sind oftmals multilokulär. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Urothelkarzinome (90-95%). Ca. 70-80% der erstmalig diagnostizierten Urothelkarzinome sind nicht-muskelinvasiv und zeichnen sich durch ein hohes Progressions- und Rezidivrisiko aus: bei ca. 10-20% der Patienten mit initial nicht-muskelinvasivem Urothelkarzinom schreitet der Tumor zu einem muskelinvasivem Tumor fort, bis zu 70% erleiden ein Rezidiv (6,7). Dieses hohe Risiko zieht eine engmaschige und lebenslange Nachsorge mit sich, was unter anderem mit sehr hohen Therapiekosten verbunden ist (3). 20-30% der neu diagnostizierten Urothelkarzinome wiederum sind muskelinvasiv mit hohem Metastasierungsrisiko: trotz aggressiver Therapie treten bei nahezu 50% der Betroffenen innerhalb von 5 Jahren Metastasen auf - ohne Therapie läge die Sterblichkeitsrate bei 80% innerhalb von 2 Jahren (3,4,7).

Weitere histologische Formen des Harnblasenkarzinoms sind neben dem Urothelkarzinom das Plattenepithelkarzinom der Harnblase, das in ca. 7% der Fälle auftritt oder das Adenokarzinom, welches häufig an der Einmündungsstelle des Urachus am Blasendach lokalisiert ist (ca. 1% der Fälle) (3).

Die Ätiologie von Harnblasenkarzinomen bleibt oftmals ungeklärt. Der größte bekannte Risikofaktor ist das Rauchen, das nach Studien für etwa 50 Prozent aller Blasenkarzinome verantwortlich ist (8). Dabei ist die Dauer des Zigarettenkonsums,

die Anzahl der gerauchten Zigaretten sowie der Grad der Inhalation positiv assoziiert mit dem Risiko ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln (3,9). Für die kanzerogene Wirkung im Zigarettenrauch werden hauptsächlich aromatische Amine wie β -Naphthylamin und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe verantwortlich gemacht, die renal ausgeschieden werden und krebserregend auf das gesamte Harnsystem wirken (10). Die kanzerogene Wirkung aromatischer Amine entsteht dabei durch ihre Metaboliten, die bei der Hydroxylierung und Glukuronidierung in der Leber entstehen - durch die N-Acetyltransferase kann der Körper diese allerdings weitgehend unschädlich machen. Genetisch bedingt sind jedoch manche Menschen schnelle oder aber langsame Acetylierer. So hat also beispielsweise derjenige Raucher, der gleichzeitig auch Langsam-Acetylierer ist, ein zusätzlich erhöhtes Risiko, ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln (3,10). Ein weiterer großer Risikofaktor zur Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms ist die berufliche Exposition gegenüber genannter Karzinogene sowie gegenüber Benzidin, Fuchsin, Anilin, Auramin, 4-Aminobiphenyl und o-Toluidin. Diesen schädlichen chemischen Verbindungen ist man beispielsweise in der Farbstoff-, Gummi-, Leder-, Textil-, Metall- oder Färbemittelindustrie ausgesetzt. Schätzungsweise 20% der Harnblasenkarzinome sind der beruflichen Schadstoffexposition zuzuschreiben (7,10). Bei Auftreten von Symptomen der unteren Harnwege ist die Assoziation mit Karzinogenen bzw. mit dem Beruf nicht immer auf den ersten Blick zu erkennen und wird u.a. dadurch erschwert, dass die Latenzzeit zwischen Exposition und der Karzinomentstehung im Mittel 24 Jahre beträgt (9,11). Auch Personen mit chronischen Harnwegsinfektionen, insbesondere in Kombination mit rezidivierender mechanischer Irritation (zum Beispiel verursacht durch lange Dauerkatheterdrainage) haben ein erhöhtes Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken. Für die Tumorentstehung in Zusammenhang mit chronischen Infektionen wird die latent andauernde Exposition mit Nitriten und Nitrosaminen, die von Bakterien gebildet werden können, verantwortlich gemacht. Auch bei Bilharziose, einer in Afrika und in arabischen Ländern endemischen Infektion mit *Schistosoma haematobium*, aus der sich bei fehlender Therapie eine chronische Zystitis entwickelt, ist die Gefahr insbesondere zur Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms erhöht. Die ausschließlich auf der Balkanhalbinsel in der Donauregion, und zwar in Bosnien, Bulgarien, Kroatien, Rumänien und Serbien auftretende Balkannephropathie führt zu einem 12-fach häufigerem Auftreten eines Harnblasentumors. Bestimmte

Medikamente wie das Analgetikum Phenacetin oder das Zytostatikum Cyclophosphamid, aber auch Radiatio werden ebenfalls als auslösende Substanzen bzw. Faktoren erachtet (3,7,9,12). Neben den Kanzerogenen spielt die vererbte genetische Prädisposition beim Harnblasenkarzinom eine vergleichsweise geringe Rolle (9).

1.2.3 TNM-Stadium und WHO-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms ist in den letzten Jahren im Wesentlichen unverändert geblieben. Die T-Kategorie beurteilt die lokale Tumorausdehnung (siehe Abbildung 3) und unterteilt die Harnblasenkarzinome in nicht-muskelinvasive (pTa, pTis und pT1) und muskelinvasive Tumoren ($\geq T2$). Ta bezeichnet papilläre, nicht invasive Karzinome, Tis/Cis das Carcinoma in situ, bei T1 infiltriert der Tumor in das subepitheliale Bindegewebe (bis zur Lamina propria). Im Stadium T2 reicht der Tumor bis in die Tunica muscularis, wobei T2a eine Infiltration bis zur inneren, oberflächlichen Hälfte der Muskulatur und T2b eine Infiltration der äußeren Hälfte der Muskulatur beschreibt. Im Stadium T3 hat der Tumor perivesikales Fettgewebe erreicht, T3a bezeichnet dabei die mikroskopisch sichtbare und T3b die makroskopisch sichtbare Infiltration. Bei Beteiligung von Nachbarorganen wird der Tumor als T4 kategorisiert: sind Prostata, Uterus oder Vagina betroffen, entspricht die Einteilung dem Stadium T4a, sind bereits Becken- oder Bauchwand infiltriert, wird der Tumor als T4b kategorisiert (4,11).

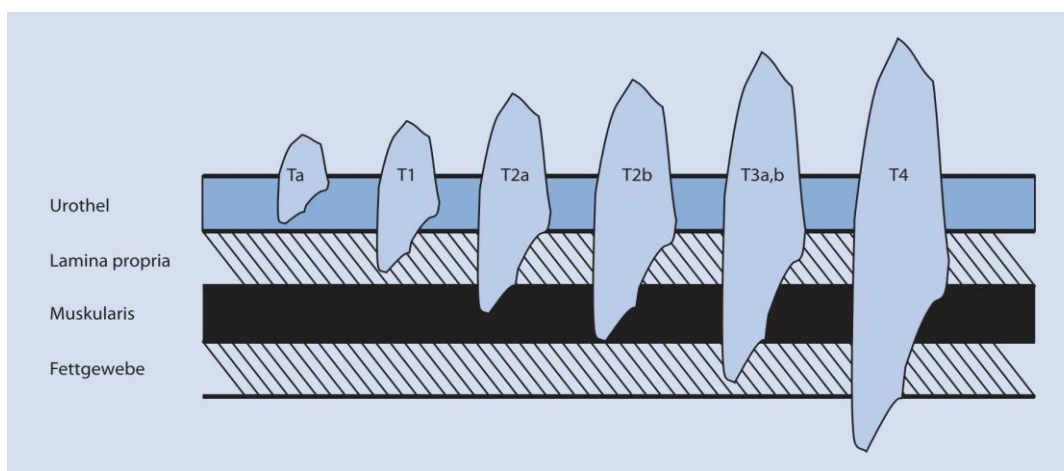


Abbildung 3: T-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (11)

Die Organ überschreitende Tumorausdehnung wird mittels N (Lymphknotenbefall) und M (Metastasierungsgrad) beschrieben. Bei N0 liegen keine regionären Lymphknotenmetastasen vor. N1 beschreibt das Vorhandensein einer solitären Lymphknotenmetastase des wirklichen Beckenbereiches (hypogastrisch, obturatorisch, präsakral oder im Bereich der Arteria iliaca externa gelegen), bei N2 liegen mehrere Metastasen in einem Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches vor. N3 bezeichnet das Vorhandensein von Metastasen in Lymphknoten entlang der Arteria iliaca communis. Bei M0 sind keine, bei M1 sind Fernmetastasen vorhanden. Der Zusatz (m) zeigt an, dass multiple Läsionen vorliegen, (is) weist auf ein assoziiertes Carcinoma in situ hin (4,7). Anhand der TNM-Klassifikation werden wichtige Diagnose- und Therapieentscheidungen getroffen, sie dient bis dato zur Einschätzung der Prognose. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.

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

Tabelle 1: TNM Klassifikation - Urothelkarzinom der Harnblase (12)

Neben der TNM-Klassifikation werden Harnblasentumoren auch nach histologischem Tumortyp eingeteilt. Das ursprüngliche Grading-System der WHO von 1973 wurde zusammen mit der International Society of Urological Pathology (ISUP) im Jahr 2004 erneuert und 2016 nochmals aktualisiert (4,12). Tabelle 2 zeigt einen Überblick über beide Systeme. Demnach werden nicht-invasive urotheliale Tumore eingeteilt in: Papillome (nicht invasive papilläre Neoplasie, ausschließlich gutartig), PUNLMP (papillary urothelial neoplasms of low malignant potential), LG-PUC (low grade papillary urothelial carcinoma), HG-PUC (high grade papillary urothelial carcinoma) und CIS (carcinoma in situ). PUNLMP entspricht in etwa dem früheren TaG1, LG-PUC dem Stadium TaG1/TaG2, HG-PUC entspricht in etwa TaG2/TaG3 (3,4).

Grading 2004/2016		Grading 1973
Urotheliales Papillom	ausschließlich benigner Tumor	Urotheliales Papillom
Papilläre Neoplasie mit niedrig malignem Potential (PUNLMP)	benigner Tumor, der aber geringe histologische Zeichen eines malignen Tumors zeigt	Grad 1 (G1): gut differenziert
Low-grade Karzinom	entspricht in etwa einem malignen G1-G2 Tumor	
High-grade	entspricht weitestgehend einem malignen G2-G3 Tumor	Grad 2 (G2): mäßig differenziert
		Grad 3 (G3): schlecht differenziert/ undifferenziert

Tabelle 2: Gegenüberstellung der WHO –Klassifikationen von 1973 und 2004/2016 für nicht-invasive papilläre Karzinome (Ta)

Grund für die Neuerung im Jahr 2004 war hauptsächlich eine hohe Interobserver-Variabilität bei der Graduierung, die die Prognosevorhersage für den einzelnen Patienten in Frage stellte (13,14). Mit der alten Klassifizierung wurde die G2 Graduierung überproportional häufig, sozusagen als Standarddiagnose, diagnostiziert (15,16). Die neue Klassifizierung ist ein Versuch, urotheliale Tumor-Gradierung zu standardisieren und die Reproduzierbarkeit der Diagnose verschiedener Pathologen zu verbessern, indem die morphologischen Eigenschaften von nicht-invasiven papillären urothelialen Neoplasmen klar definiert werden. So führte man die PUNLMP-Kategorie ein, definiert als papillärer urothelialer Tumor, der zwar dem exophytischen Urothelpapillom ähnelt, aber eine erhöhte Zellproliferation zeigt und dabei die Dicke des normalen Urothels übersteigt. Diese neue Gruppierung sollte Papillome detektieren, die trotz Benignität entarteten – eine Subgruppierung sei ein Zugewinn für eine exaktere Prognosevorhersage (17). Eine Verringerung der Interobserver-Variabilität durch die Klassifikation von 2004 konnte allerdings in einer Studie von Sharma, Kini et al. 2015 nicht verzeichnet werden (14,18): Hier wurden

50 transurethrale Tumorresektate und Harnblasenbiopsien von 4 unterschiedlichen Pathologen, jeweils mit mindestens 20 Jahren Erfahrung in histopathologischer Berichterstattung, unabhängig voneinander untersucht - nie stimmten die 4 Beobachter einstimmig der Diagnose PUNLMP zu. Lediglich für HG-PUC sei die Übereinstimmung befriedigend gewesen. Insgesamt wurde in der Studie eine signifikante Interobserver-Variabilität beim Grading des Urothelkarzinoms festgestellt (18). Ein weiterer Aspekt bei der neuen Graduierung ist außerdem, dass eine Tendenz zur Unterdiagnostizierung des HG-PUC festgestellt wurde, und zwar hin zum LG-PUC (19). Dafür könnte unter anderem verantwortlich sein, dass manche Untersucher die Graduierung anhand der überwiegend vorherrschenden Morphologie im Präparat festlegen und dabei kleinere Areale mit High-grade Morphologie außer Acht lassen, wie Sharma, Kini et al. in ihrer Studie beobachteten. Dabei sollte das Grading in papillären urothelialen Tumoren jedoch auf dem schlechtesten morphologischen Fund basieren (18). Bevor Patienten einer radikalen Therapie unterzogen werden, sollte deshalb idealerweise die Begutachtung der Biopsien durch mindestens zwei oder mehrere Pathologen durchgeführt werden (13). Außerdem sollte, solange die WHO-Klassifikation von 2004 noch nicht ausreichend evaluiert ist, die alte Klassifikation parallel angegeben werden (3,12).

1.3 EMT

Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen Vorgang, bei dem sich Zellen mit epithelialem zu einem mesenchymalen Phänotyp umwandeln, indem vermehrt mesenchymale und vermindert epitheliale Marker exprimiert werden. Epithelzellen werden dadurch weniger adhäsiv, dafür mehr migratorisch und invasiv (20). Viel Aufmerksamkeit erfuhr der Prozess, seit Greenburg und Hay 1982 erstmals das in vitro Verhalten von verschiedenen Epithelzellen in einem Gel aus Kollagen beschrieben haben: in der neu geschaffenen Umgebung lösten sich die Epithelzellen von ihrem Verband ab, wanderten und veränderten ihren Phänotyp hin zu mesenchymalem Charakter: die Epithelzellen verloren zum Beispiel ihre apiko-basale Polarität und bildeten Pseudopodien und Filopodien (Zellfortsätze aus Aktinfilamenten) aus, die typisch für migratorische Zellen sind (21).

Physiologischerweise spielt EMT eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung oder der Wundheilung. Aber auch bei pathologischen Prozessen wie Organfibrose und Tumorprogression bzw. Metastasenbildung wird EMT beobachtet: einzelne Epithelzellen können sich durch Änderung ihres Charakters von ihrem Ursprungsgewebe lösen und von ihrem Zellverband abwandern (20). Erst durch Ausbildung des mesenchymalen Phänotyps kann beispielsweise die Basallamina des Urothels (vorwiegend bestehend aus Kollagen IV und Laminin) durchbrochen werden und der Tumor invasiv bzw. maligne werden. Proteolytisch wirksame Typ-IV-Kollagenasen, die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), fördern dabei den Abbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix. Durch Eintritt der entarteten Zellen in lokale Blutgefäße und anschließend organferner Extravasation können sie sich durch Wechselwirkung mit der neuen Umgebung wieder in einem neuen Organ im Sinne einer Metastase ansiedeln. Hierbei können sich die EMT-Zellen wieder in einen epithelialen Phänotyp umwandeln, was als mesenchymal-epitheliale Transition, (MET) bezeichnet wird (siehe Abbildung 4) (20,22–26). In Bezug auf die Tumorprogression könne EMT als pathologischer, aus der Entwicklung stammender und beim Erwachsenen reaktivierter Prozess verstanden werden (27).

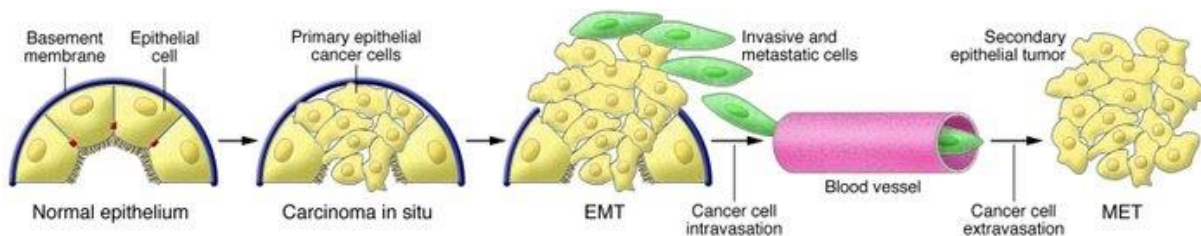


Abbildung 4: Modell der Rolle von EMT in der Tumorprogression (20)

Zu den Veränderungen, die beim Prozess der EMT beobachtet werden, zählen: ein Verlust der starken mechanischen Zellverbindungen, ein Verlust der apiko-basalen Zellpolarität und eine Resistenz der Zellen gegen Apoptosestimuli. Als wichtige Kennzeichen der EMT werden beispielsweise der Verlust von E-Cadherin, Zytokeratinen oder Proteinen der tight junctions (zonula occludens 1 oder occludin) bei gleichzeitiger Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin, Fibronectin, Fibroblasten spezifischem Protein 1 (FSP-1), α -smooth muscle actin (α -

SMA) und N-Cadherin erachtet (siehe Abbildung 5). Die Zellen mit mesenchymalem Charakter produzieren zudem neue Matrix aus Typ I Kollagen und Fibronectin, entlang derer sie in umliegendes Gewebe einwandern können (2,20,28).

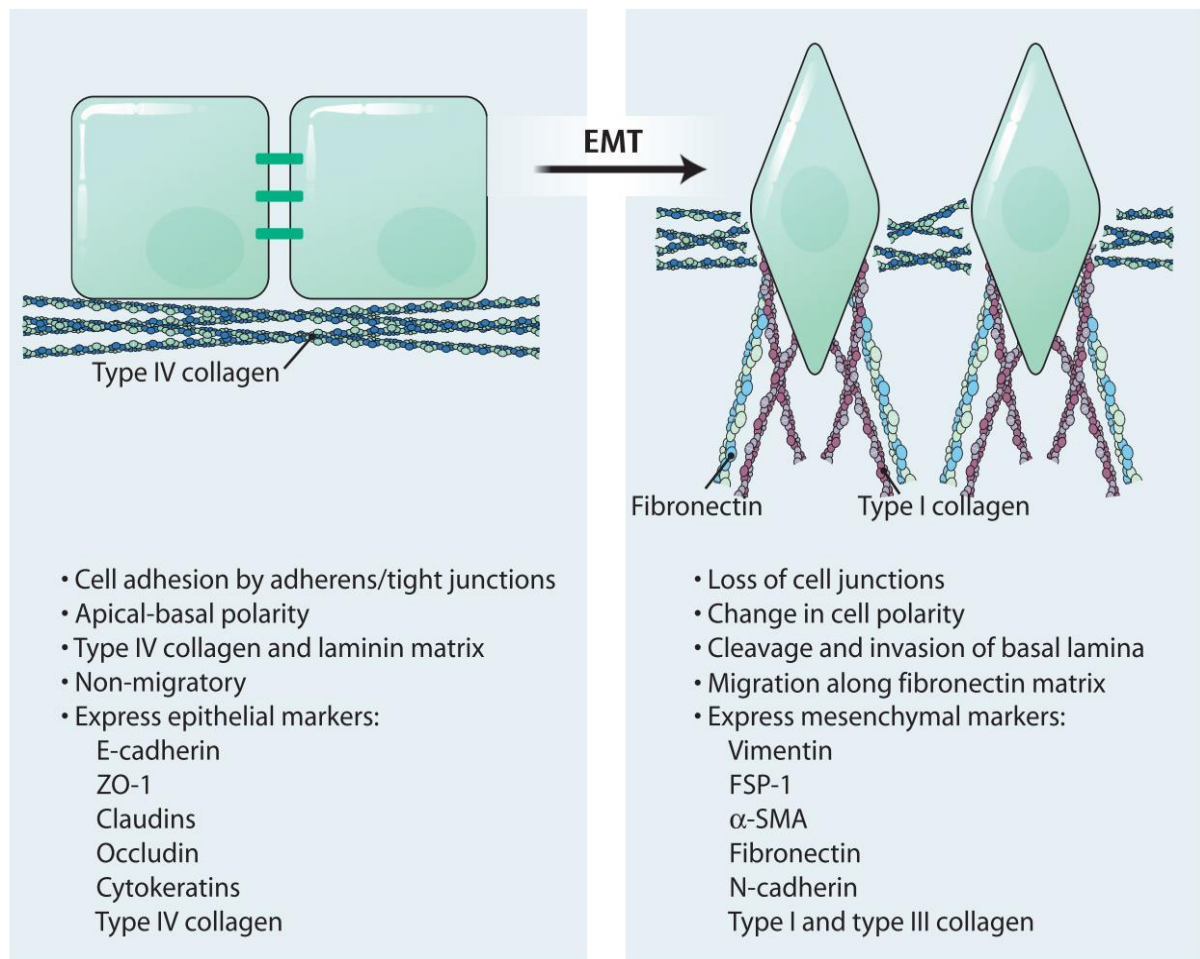


Abbildung 5: Zelluläre Veränderungen, die mit EMT assoziiert sind (28)

Ein Wechsel von E-Cadherin- zu vermehrter N-Cadherin- und/ oder P-Cadherin-Expression wird dabei als Cadherin-Switch bezeichnet und wurde schon in mehreren Studien bei Karzinomen epithelialen Ursprungs beobachtet (29–32).

Induziert wird die EMT durch diverse Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Zeb-1, Zeb-2, Slug (=Snail2), Snail1 und Twist: durch Hypermethylierung und Histondeacetylierung an der Promotorregion durch Slug, Snail oder Twist wird E-Cadherin epigenetisch stummgeschaltet. So führe beispielsweise eine

Überexpression von Twist zu einer Umwandlung von epithelialem zu mesenchyalem Zellcharakter (20,33). Beim umgekehrten Prozess der MET wiederum gehe eine Abnahme von Twist1 mit einer Reexpression von Epithelmarkern wie E-Cadherin einher (25,33). Untersuchungen zeigten, dass auch in Blasenkarzinomgewebe eine Twist-Expression mit schlechtem progressionsfreiem Überleben einhergeht. Sie korreliere außerdem mit höherem Tumorstadium, höherem Tumorgrad und mit reduzierter E-Cadherin-Expression (34,35).

1.4 Stellenwert der immunhistochemischen Marker

1.4.1 Zellkontakte und die Rolle von Cadherinen und Cateninen

Zu Zellverbindungen gehören neben Verschluss- und Kommunikationskontakten die Haftkontakte (Adhäsionskontakte). Adhäsionskontakte sind mechanische Verbindungen von Zellen, wobei die Verankerung entweder an der Nachbarzelle (interzelluläre Haftkontakte) oder zwischen Zelle und Extrazellulärmatrix (Zell-Matrix-Kontakte) bestehen kann (2). Zu den interzellulären Haftkontakten wiederum gehören Desmosomen und Adhärens-Kontakte, bei denen Cadherine und Catenine eine wichtige Rolle spielen. Cadherine zählen dabei zu den Transmembranproteinen der interzellulären Verbindungen, die mit ihrer intrazellulären Domäne über Plaque-Proteine die Verbindung mit dem Zytoskelett der Zellen vermitteln (2). Zu den Plaque-Proteinen an der intrazellulären Seite gehören die Catenine, also Ankerproteine wie beispielsweise α -Catenin, β -Catenin, γ -Catenin (auch bekannt als Plakoglobin), p120 Catenin, Vinculin oder α -Actinin, welche entweder mit Aktinfilamenten (im Adhärens-Kontakt) oder Intermediärfilamenten (im Desmosom) des Zytoskeletts verlinkt sind. An ihrer extrazellulären Domäne stellen die Cadherine hauptsächlich interzelluläre Bindungen her (2,33). Eine Übersicht über die interzellulären Haftkontakte zeigt Abbildung 6: Im Adhärenskontakt (A) sind die Cadherine (in Epithelien meist E-Cadherin) unter anderem über α -Catenin (α), β -Catenin (β) und Vinculin (v) mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden. In Desmosomen (B) stellen beispielsweise γ -Catenin (= Plakoglobin, PG), Plakophilin (PP) und Desmoplakin (DP) die Verbindung mit Intermediärfilamenten (IF) her (2,36).

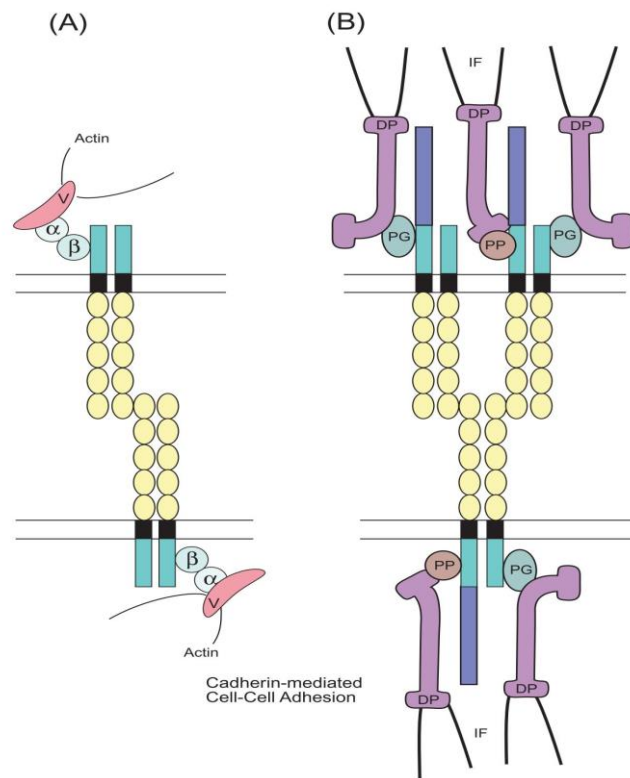


Abbildung 6: Interzelluläre Haftkontakte: Aufbau eines Adhäsionskontaktes (A) und eines Desmosoms (B); aus Angst, Marcozzi et al. (36)

Bei diesen beiden Zellkontakten werden dabei vermutlich zwei Zellen immer über Cadherine der gleichen Subgruppe miteinander verbunden (homophile Adhäsion), und zwar immer über das N-terminale Ende der extrazellulären Cadherin-Domäne. Diese Enden dimerisieren lateral und bilden jeweils einen terminalen Knauf sowie eine hydrophobe Tasche, in die sich jeweils der terminale Knauf des gegenüberliegenden Cadherins einfügt (33,36,37). Cadherine (calciumabhängige **Adherine**) können allerdings nur in Anwesenheit von Calcium-Ionen eine Verbindung mit ihrem Gegenüber eingehen. Der extrazelluläre Teil besteht aus einer für jedes Cadherin typischen Anzahl von kompakten Domänen, den sog. Cadherin-Wiederholungseinheiten (Cadherin-Domänen, "cadherin repeats"); diese sind durch primär bewegliche Gelenkregionen miteinander verbunden. Erst mit der Bindung von Ca^{2+} im Bereich dieser Regionen wird der extrazelluläre Teil des Cadherins starr und die Domänen können dimerisieren. Entfernt man Calcium aus dem Extrazellulärraum, löst sich auch die Verbindung (33). Das Cadherin, welches in der Literatur als erstes beschrieben wurde, war (epitheliales) E-Cadherin (1981), gefolgt von (neuronaalem) N-Cadherin und (plazentarem) P-Cadherin, danach wurden bald

immer mehr entdeckt (36). Die initiale Namensgebung erfolgte dabei nach dem Gewebe, in dem sie am deutlichsten exprimiert wurden - dieses Schema konnte jedoch bei nachfolgend entdeckten Cadherinen nicht immer beibehalten werden, da man herausfand, dass Cadherine zum einen in vielen verschiedenen Gewebearten und zum anderen mit unterschiedlicher Häufigkeit auftreten (38). Mittlerweile sind über 180 verschiedene Cadherine bekannt. E-Cadherin, P-Cadherin, N-Cadherin sowie (vaskulär-endotheliales) VE-Cadherin gehören dabei zu der Gruppe der klassischen Cadherine, welche alle eine ähnliche extra- und intrazelluläre Domäne vorweisen. Klassische Cadherine haben außerdem nicht nur adhäsive Funktion: ihre intrazelluläre Domäne spielt auch eine wichtige Rolle bei Signalübertragungen ins Zellinnere und der Regulation der Cadherinfunktion, die Zelle kann so den Zustand ihrer Bindung entweder lösen oder wieder herstellen (33,36). Durch Modifikation der Catenine oder Dissoziation des Catenin-Cadherin-Komplexes kann eine Umwandlung von Zellen beziehungsweise Geweben erreicht werden, wie sie auch im Rahmen der EMT stattfindet (39). Die tatsächliche Induktion des EMT-Programms durch die Zelle hängt also von einer Reihe intrazellulärer Signalkaskaden ab, an denen unter anderem auch β -Catenin beteiligt ist. (20) Die in dieser Arbeit untersuchten Marker E-Cadherin, N-Cadherin, β -Catenin und γ -Catenin können also als klassische Marker der EMT betrachtet werden.

1.4.2 Rolle von TIMP1 und FGFR3

TIMP1

Die Extrazellulärmatrix befindet sich bekanntermaßen in einem ständigen Umbau: abgenutzte Bestandteile wollen ersetzt werden, der Extrazellulärraum muss immer wieder an geänderte mechanische Funktionen angepasst werden und nicht zuletzt wird dort ein Weg für migratorische Zellen und für die Angiogenese gebahnt. Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind dabei beteiligt am Abbau der Extrazellulärmatrix, die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) wiederum sind ein wichtiger Gegenspieler beziehungsweise endogener Regulator der MMPs (40,41). Physiologischerweise besteht ein ausgeglichenes System dieser antagonistischen Proteine. Überwiegt der Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) oder

ist die Neubildung der EZM reduziert – besteht also insgesamt eine erhöhte Abbauaktivität - resultieren daraus Pathologien wie beispielsweise degenerative Veränderungen des Binde- und Stützgewebes. Zudem soll die erhöhte Abbauaktivität bei einem Ungleichgewicht von MMPs und TIMPs auch mit invasivem Charakter von Tumorzellen assoziiert sein (42–45). TIMPs agieren aber nicht nur als Gegenspieler der MMPs, sondern fördern auch das Zellwachstum und fungieren als Apoptoseinhibitoren (46–48) – demnach sind TIMPs auch tumorigene Eigenschaften zuzuordnen. Insgesamt besteht die Familie der TIMPs aus 4 Mitgliedern (TIMP 1 bis 4) - vor allem TIMP-1 korreliert bei Krebspatienten häufig mit einer schlechten Prognose (40,49,50). Ein weiterer Aspekt ist, dass TIMP1 und auch die MMPs scheinbar eine wichtige Rolle beim Prozess der EMT spielen: zum einen wird die Wandlung zum migratorischen Zellcharakter unter anderem durch die MMPs ermöglicht, da diese imstande sind, die Basalmembran abzubauen, die so zum Zweck der Invasion durchbrochen werden kann. Zum anderen induziert die TIMP1-Expression wohl Veränderungen der phänotypischen Zellmorphologie, der Zelladhäsion, des Zytoskelett-Umbaus und der Motilität – Veränderungen, die auf den Prozess der EMT hindeuten, wie D'Angelo, Liu et al. 2014 in einer Studie mit Mammakarzinomzellen zeigten (48). Aus diesem Grund und den anderen genannten Faktoren liegt es nahe, bezüglich der Suche nach einem prognostischen Marker für den onkologischen Verlauf bei Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase auch TIMP1 zu untersuchen.

FGFR3

FGFR-Proteine sind Wachstumsfaktorrezeptoren, die in 4 Subtypen eingeteilt werden. Dazu gehört unter anderem FGFR3 - eine Rezeptor-Tyrosinkinase mit einer Transmembrandomäne. Die Bindung des Liganden FGF (fibroblast growth factor) auf der extrazellulären Seite induziert die Dimerisierung der Rezeptormonomere und damit deren Aktivierung, wodurch verschiedene Signalwege in Gang gesetzt werden, welche die Proliferation, Differenzierung und Migration der Zelle steuern (51–54). Grundsätzlich können natürlich auch aberrante FGFR-Signale entstehen. Diese resultieren entweder aus einer ligandenabhängigen FGFR-Aktivierung durch ein erhöhtes Angebot von FGFs (beispielsweise durch Tumor- oder Stromazellen

sezerniert), oder aus einer ligandenunabhängigen FGFR-Aktivierung durch eine molekulare Veränderung eines FGFR (beispielsweise durch eine Mutation oder Translokation) (53). Eine solche ligandenunabhängige FGFR-Aktivierung kann beispielsweise zum Krankheitsbild der Achondroplasie führen: eine Mutation im FGFR3-Gen auf Chromosom 4p16 führt zu einer Stabilisierung von FGFR3-Dimeren - die daraus resultierende Überaktivität von FGFR3 hemmt die Chondrozytenproliferation und somit die enchondrale Ossifikation (54–56). Nicht nur mit der Achondroplasie, auch mit Karzinomentstehung wurden FGFR3-Mutationen vielfach in Verbindung gebracht, wie beispielsweise bei Hauttumoren oder beim Multiplen Myelom (52,57–59). Auch für das Harnblasenkarzinom können FGFR3-Mutationen ursächlich sein, und zwar insbesondere bei ca. 60-80% der nicht-invasiven low-grade Tumoren. Bei muskelinvasiven Tumoren wiederum finden sich FGFR3-Mutationen deutlich weniger häufig: 10-20% der Tumoren ab Stadium T2 zeigen eine FGFR3-Mutation. Insgesamt sind Harnblasentumoren mit einer FGFR3-Mutation eher mit einer guten Prognose vergesellschaftet (60). Demgegenüber liegt den invasiven high-grade Tumoren und dem CIS häufiger eine p53-Mutation zugrunde. Man spricht deshalb von einer zweigeteilten Tumorentstehung des Harnblasenkarzinoms (3,26,60–63).

Interessanterweise gibt es eine synergistische Wirkung von N-Cadherin und FGFR3, welche bedeutend für die Regulation der Zellmigration ist (51). Scheinbar hat die Kooperation von N-Cadherin mit dem FGF-Rezeptor Signale zur Folge, die zur Hochregulation von MMP-9 und damit zur Zellinvasion führen (29). Auch Li, Zhang et al. beschrieben 2019 einen Zusammenhang zwischen Cadherinen beziehungsweise EMT und FGFR3: so führte ein Ausschalten des Gens, das für FGFR3 codiert, zu einer Herunterregulierung von E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin (57). Aufgrund dessen soll auch die Untersuchung der immunhistochemischen FGFR3-Expression in diese Arbeit mit einfließen.

1.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund der hohen Morbidität des Harnblasenkarzinoms sowie dem hohen Metastasierungs- bzw. Progressrisiko insbesondere bei muskelinvasiven Tumoren

der Harnblase ist es ein Bestreben, dessen Therapie weiter auszubauen und zu optimieren (61). Für die Planung einer optimalen Therapiestrategie ist es nötig, das biologische Tumorpotential genauer festzulegen, um so eine bessere Vorhersage bezüglich des Tumorverhaltens geben zu können. Grundsätzlich sind zur Einschätzung des onkologischen Verlaufs von Tumoren klinische und histopathologische Marker ein wichtiger Gegenstand. So sind für das Harnblasenkarzinom derzeit Tumorstadium und Differenzierungsgrad die primären Kriterien, die zur Prognosevorhersage herangezogen werden und die letztlich den Behandlungsverlauf beeinflussen. Die alleinige Verwendung dieser Kriterien zur Einschätzung des onkologischen Verlaufs bringt jedoch gleichzeitig eine starke Abhängigkeit von der histopathologischen Begutachtung mit sich. Es werden also dringend Indikatoren gesucht, die unabhängig davon die Prognose patientenindividuell und zuverlässig vorhersagen (18). In Bezug auf Harnblasenkarzinome sind in den letzten Jahren zahlreiche Marker untersucht worden, für die teilweise tatsächlich prognostische Aussagekraft gezeigt werden konnte: so seien beispielsweise der Proliferationsmarker Ki-67 zusammen mit CK20 als potentielle Marker zur Verbesserung der Risikostratifizierung bei pT1 Harnblasentumoren geeignet (64). Breyer et al. konnten 2016 verdeutlichen, dass auch die EMT-Marker E-Cadherin und Survivin in Bezug auf Stadium pTa mögliche Prognosemarker für das Urothelkarzinom darstellen könnten: der Verlust von E-Cadherin sowie Survivin-Überexpression seien mit schlechterem progressionsfreiem Überleben assoziiert (65). Bisher wurde jedoch noch kein immunhistochemischer Marker klinikübergreifend in den medizinischen Alltag integriert. Lediglich in Zweifelsfällen kann laut dem aktuellen Leitlinienprogramm Onkologie der deutschen Krebsgesellschaft beim nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom eine Immunhistochemie mit CK 20, Ki67 und p53 zur Unterscheidung von LG- und HG-PUC erfolgen. Diese Marker seien Zeichen eines erhöhten Rezidiv- und Progressionsrisikos und in zahlreichen retrospektiven Studien bereits untersucht, aber noch nicht prospektiv validiert worden (12). Zur Prognoseeinschätzung nach radikaler Zystektomie empfiehlt die Leitlinie, nach wie vor die TNM-Klassifikation zu Rate zu ziehen. Insbesondere muskelinvasive Blasenkarzinome betreffend besteht daher zwingend weiterer Forschungsbedarf bezüglich eines prognostischen Markers. Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung des Einflusses der EMT-Marker-Expression auf den onkologischen Verlauf von Patienten mit muskelinvasivem

Urothelkarzinom der Harnblase nach radikaler Zystektomie. Im Speziellen soll die Wertigkeit der Marker E-Cadherin, N-Cadherin, β -Catenin, γ -Catenin, TIMP1 sowie FGFR3 untersucht werden. Möglicherweise können durch die Untersuchungsergebnisse zukünftige Therapieentscheidungen patientenindividuell angepasst werden und den Behandlungserfolg des muskelinvasiven Harnbasenkarzinoms günstig beeinflussen.

2 Material und Methoden

Es erfolgte die retrospektive Datenerhebung klinischer und histopathologischer Parameter von 146 Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase und stattgehabter radikaler Zystektomie im Zeitraum von 2006 bis 2011 an der urologischen Abteilung der Universität Regensburg. Die Zystektomiepräparate wurden histopathologisch aufgearbeitet: nach Fixierung in Formalin sowie Einbettung in Paraffin wurden die histologischen Schnitte von Mitarbeiterinnen des Forschungslabors immunhistochemisch eingefärbt und die einzelnen EMT-Marker (E-Cadherin, N-Cadherin, β -Catenin, γ -Catenin, TIMP1 sowie FGFR3) mikroskopisch untersucht. Im Zuge der mikroskopischen Analyse wurden die Lokalisation und die Intensität der Färbung festgehalten, und zwar einerseits in erkranktem und andererseits in (angrenzendem) normalem Urothel. Im weiteren Verlauf wurde mittels statistischer Analysen unter anderem der Zusammenhang zwischen EMT-Färbung im Gewebe und dem krebsspezifischen Überleben untersucht.

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von 2006-2011 wurde von 146 Patienten mit initial diagnostiziertem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom und stattgehabter radikaler Zystektomie retrospektiv folgende klinische Daten erhoben:

- Alter und Geschlecht

- Größe, Gewicht und Body Mass Index (BMI)
- adjuvante Chemotherapie (0 = nein, 1 = ja)
- ECOG-Status (Performance Status der Eastern Cooperative Oncology Group, 0-4)
- ASA-Risikoklassifikation (American Society of Anesthesiologists, 1-6)
- Charlson Comorbidity Index CCI (Anzahl der Punkte)
- pT der Zystektomie (0= T0, 1= Ta, 2= Tis, 3= T1, 4= T2, 5= T3, 6= T4)
- Schnittrand (0 = R0, 1 = R1, 2 = R2)
- Lymphknotenstatus (0 = N0, 1 = N1, 2 = N2)
- Harnableitung (1= Ileumconduit, 2= Indiana-Pouch, 3= Neoblase, 4= Ureterostomie, 5= sonstige)
- OP-Dauer in Minuten
- Raucherstatus (0= niemals geraucht, 1= in der Vergangenheit geraucht, 2= raucht derzeit)
- Lokalrezidiv (0= nein, 1= ja)
- systemisches Rezidiv (0= nein, 1= ja)
- klinisches M-Stadium (0= keine Fernmetastasen, 1= Fernmetastasen im CT)
- lymphovaskuläre Invasion LVI (0= nein, 1= ja)
- CIS im Tumorpräparat (0= nein, 1= ja)
- Datum der Zystektomie
- letzter Follow-Up-Kontakt oder Todestag
- Follow Up ab Zystektomie in Monaten
- Status des Patienten (0= verstorben, 1= lebt ohne Rezidiv, 2= lebt mit Rezidiv, 3= lebt mit Rezidiv und hat Chemo/Radiatio, 4= lebt in Palliation),
- Datum des Rezidivs
- Follow-Up in Monaten bis zum Auftreten des Rezidivs
- Art des Rezidivs (0= kein Rezidiv bzw. nicht bekannt, 1= systemisches Rezidiv, 2= Lokalrezidiv)
- Gesamtüberleben OS (overall survival; 0= lebt, 1= verstorben)
- Krebspezifisches Überleben CCS (cancer specific survival; 0= lebt oder nicht am Tumor verstorben, 1= am Tumor verstorben)
- Datum des Todestages

Die Daten wurden von der Urologischen Abteilung der Universitätsklinik Regensburg bereitgestellt und von September 2017 bis Februar 2018 aktualisiert. Hierzu wurde

entweder der Patient selbst, dessen Angehörige oder dessen behandelnder Arzt kontaktiert.

2.1.2 Patientenmaterial

Die zu jedem Patienten gehörigen Gewebeproben stammen aus dem Forschungslabor der Klinik für Urologie an der Universität Regensburg. Es wurde möglichst von jedem Patienten sowohl Tumor- als auch Normalgewebe zur Verfügung gestellt. Drei Gewebeproben konnten auch nach wiederholter immunhistochemischer Färbung nicht ausgewertet werden, da nicht genügend Zellmaterial für die Auswertung vorhanden war. Insgesamt liegen von 132 Patienten Proben vor: Tumorgewebe konnte von 92 Personen isoliert und ausgewertet werden, normales Urothel liegt von 130 Patienten vor und bei 90 Patienten ist sowohl Tumor- als auch gesundes Gewebe zum Vergleich vorhanden. Tabelle 2 zeigt einen Überblick über vorhandene Präparate.

Parameter	Anzahl der Präparate
Präparate mit Tumorgewebe	92
Präparate mit gesundem Gewebe	130
Tumorgewebe und gesundes Gewebe bei gleichem Patienten vorhanden	90

Tabelle 3: Überblick Patientenmaterial

2.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Gewebeproben wurden nach Gewinnung in 4% neutral gepufferter Formaldehydlösung chemisch fixiert und mit aufsteigender Alkoholreihe entwässert, anschließend wurde Ethanol durch das Intermedium Xylol ersetzt. Xylol wiederum wurde ersetzt durch Durchtränken des Gewebes mit erwärmtem, flüssigem Paraffin, welches nach Abkühlen aushärtete. Im Folgenden wurden aus dem eingeblockten Gewebe mit einem Schlittenmikrotom (Microm HM450) 3µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Glasobjektträger aufgezogen.

2.3 Herstellung der HE-Färbung

Die HE-Färbung diente als hilfreiche Ergänzung bei der Beurteilung histologischer Strukturen, insbesondere um einen Überblick über erkranktes und gesundes Gewebe zu erhalten. Die HE-gefärbten Präparate lagen zu Beginn der Arbeit in der Forschungsabteilung bereits markiert vor (gesundes Urothel (blau) sowie Tumorgewebe (schwarz, rot)). Bei der HE-Färbung wird Hämatoxylin zu Hämatein oxidiert, welches mit Aluminium-Ionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Dieser färbt negativ geladenen Zell- und Gewebestrukturen wie das Chromatin des Zellkerns blau an. Die azidophilen Zellbestandteile wie das Zytoplasma und Kollagenfasern werden vom Farbstoff Eosin rot gefärbt. Die HE-Färbung der Schnitte erfolgte in folgenden Schritten:

1. Entfernen des Paraffins:
 - Eintauchen in Xylol, ca. 3 min
 - Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%)
 - 1 min Spülen mit fließendem Leitungswasser
2. Färben:
 - 3 min in Mayers Häkalaun Lösung
 - 2 sec Spülen in HCl Lösung 0,1 %
 - ca. 5 min in fließendem Leitungswasser
 - ca. 3 min in Eosin G-Lösung
 - 30 sec spülen mit fließendem Leitungswasser
3. Fixieren:
 - kurz in 70%igen, dann 96%igen Ethanol
 - 3 min in 100%igen Ethanol
 - 3 min in Xylol
 - Eindecken mit Entellan Eindeckmittel und Deckgläschen

2.4 Herstellung der immunhistochemischen Färbung

Die 3µm dicken Schnitte aus entsprechenden Paraffinblöcken wurden für die Immunhistochemie auf SUPERFROST® PLUS Objektträgern (Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co.KG, Braunschweig, Germany) aufgezogen und mit

Barcodes einer Etikettiermaschine beschriftet. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit einem Ventana BenchMark GX (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona, USA) der Firma Roche mit Hilfe eines standardisierten Ventana Protokolls. Der Antigennachweis erfolgte indirekt mittels spezifischen Primärantikörpern und dem Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit: dieses enthält einen Cocktail aus enzymmarkierten Sekundärantikörpern, die an den jeweiligen Primärantikörper binden. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde dann mit dem im DAB Detection Kit enthaltenen Wasserstoffperoxidsubstrat und 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)-Chromogen als braunes Präzipitat sichtbar gemacht. Alle hierzu benötigten Reagenzien mit Ausnahme der Antikörper wurden von Ventana bezogen:

verwendete Lösungen zur immunhistochemischen Färbung mittels BenchMark GX

- Ventana *ultraView* Universal DAB Detection Kit, beinhaltet:
 - Inhibitor: 3% Wasserstoffperoxid
 - HRP Multimer: Antikörpermischung aus Ziege anti-Maus IgGHRP, Ziege anti-Maus IgM-HRP, Ziege anti-Kaninchen-HRP (<50µg/mL) in Protein Puffer mit ProClin® 300 Konservierungsmittel
 - DAB Chromogen: 0,2% 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in firmeneigener Stabilisatorlösung mit Konservierungsmittel
 - DAB H₂O₂: 0,04% Wasserstoffperoxid in einer Phosphatpufferlösung
 - Copper: 5g/l Kupfersulfat in Acetat-Puffer mit firmeneigenem Konservierungsmittel
- 10X SSC: Natriumchlorid, 10-fach konzentriert, Natriumcitrat-Lösung in Konservierungsmittel
- Ventana Liquid Coverslip™: n-paraffinisches Hydrokarbon, gefärbt mit Oil Red O
- Ventana EZ Prep™ (10X): EZ Vorbereitungslösung in ProClin® Konservierungsmittel, 10-fach konzentriert
- Ventana Reaction Buffer (10X): Tris-Puffer (pH 7,6 +/- 0,2) in Konservierungsmittel, 10-fach konzentriert
- Ventana Cell Conditioning 1: Tris-Puffer in Konservierungsmittel
- Hematoxylin: Hämatoxylin, Glycol, Essigsäure
- Bluing Reagent: 0,1 M Lithiumcarbonat, 0,5 M Natriumcarbonat

verwendete Primärantikörper

Name	Art	Vorbehandlung/ AK Inkubation	Verdünnung	Firma	Best. Nr.
β-Catenin (E5)	monoklonal (Maus)	CC1 mild/ AK 12 Min	1:200	Santa Cruz	sc-7963
Anti-E-cadherin, NCH-38	monoklonal (Maus)	CC1 mild/ AK 20 Min	1:100	Dako	M3612
Anti-N Cadherin antibody [5D5]	monoklonal (Maus)	CC1 mild/ AK 20 Min	1:500	Abcam	ab98952
Anti-gamma Catenin antibody [4C12]	monoklonal (Maus)	CC1 mild/ AK 20 Min	1:1500	Abcam	119908
Anit-TIMP1 antibody [102D1]	monoklonal (Maus)	CC1 kurz/ AK 20 Min	1:400	Abcam	ab1827
Anti-FGFR3 antibody [EPR2305(3)]	monoklonal (Kaninchen)	CC1 mild/ AK 12 Min	1:300	Abcam	ab137084

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper zur IHC

Übersicht über die Abfolge der Färbung mit Hilfe des standardisierten Ventana-Protokolls:

- Entparaffinisierung
- Antigendemaskierung
- Blockade der endogenen Peroxidase
- Auftragung des Antikörpers
- Auftragen HRP Multimer (Sekundärantikörper)
- DAB Chromogen und DAB H₂O₂ (Färbung)
- Gegenfärbung

anschließende Arbeitsschritte:

- Objektträger in mildem Geschirrspülmittel gewaschen, um die Coverslip-Lösung zu entfernen
- Objektträger gründlich in destilliertem Wasser gespült, um das Detergenz vollständig zu entfernen
- getrocknet, gereinigt und mit Permanent-Einschlussmittel eingedeckt.

2.5 Histologische Begutachtung, Datendokumentation und statistische Auswertung

Übersicht über verwendete Materialien zur Begutachtung, Datendokumentation und Auswertung:

<u>Material</u>	<u>Typ</u>
Mikroskop	HM-Lux 3, Type 020-434.040 Hersteller: Leitz Portugal
Mikroskopkamera	Nikon DS-Fi2
Kamerasteuerungseinheit	Nikon Digital Sight DS-U3
Kamera Software	Nikon NIS-Elements
Datendokumentation	Microsoft Excel 2010
Statistikprogramm	SPSS Version 26

Tabelle 5: verwendete Materialien zur histologischen Begutachtung, Datendokumentation und Auswertung

Die pathologische Einweisung und Supervision erfolgte durch das Institut für Pathologie der Universität Regensburg. Im Zuge der mikroskopischen Auswertung wurden sowohl Tumorzellen in erkranktem Gewebe als auch Urothelzellen in gesundem Gewebe begutachtet und bewertet. Dabei wurde jeweils die Lokalisation der Färbung (nukleär, zytoplasmatisch, membranär), sowie die jeweilige Stärke der membranären Anfärbung (0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = mäßige Färbung, 3 = starke Färbung) beurteilt. Falls in ein und demselben Präparat unterschiedliche Stärken der Färbung auftraten, so wurde diejenige Färbung in die

Daten aufgenommen, die subjektiv prozentual gesehen am häufigsten vorherrschend war. Bei der nukleären und auch teilweise bei der zytoplasmatischen Anfärbung war keine unterschiedliche Kräftigkeit zu detektieren, hier wurde lediglich zwischen nicht angefärbt (keine Expression = 0) und angefärbt (positive Expression = 1) unterschieden. Weiterhin wurde bei gesundem Urothel begutachtet, ob eine Färbedominanz entweder basaler oder superfizialer Urothelzellen besteht (basal = 3, superfizial = 1) oder ob die Färbung in allen Reihen gleichmäßig betont vorliegt (gleich = 2). In Fällen mit membranärer und gleichzeitig unregelmäßig auftretender zytoplasmatischer Färbung, wurde die zytoplasmatische Färbung erst dann als positiv gewertet, wenn die subjektive Mehrheit (d.h. $\geq 50\%$) der membranär gefärbten Zellen auch gleichzeitig eine Färbung des Zytoplasmas aufwiesen. Um die Genauigkeit der Daten und deren Vergleichbarkeit zu verbessern, wurde jeder Markertyp an einem Stück begutachtet, d.h. zuerst erfolgte die komplette mikroskopische Auswertung von E-Cadherin in allen Gewebeproben, anschließend von N-Cadherin, γ -Catenin, β -Catenin, TIMP1 und letztlich von FGFR3. Nach abgeschlossener Auswertung eines Markertyps wurden nochmals einzelne Stichproben (des gleichen Untersuchers) entnommen und erneut begutachtet, um die Gültigkeit zu überprüfen. Die gewonnenen Daten wurden während der mikroskopischen Auswertung in einer Excel Tabelle dokumentiert. Um Fehler beim Dateneintrag zu vermeiden und um den Überblick zu behalten, wurde dabei zur Dokumentation pro Marker zunächst eine gesonderte Tabelle verwendet und erst am Ende der mikroskopischen Auswertung alle Markerdaten zu einer einzelnen größeren Excel Tabelle zusammengefügt. Abschließend wurden aussagekräftige Präparate ausgewählt und mittels Mikroskopkamera und entsprechender Software mehrere Fotos angefertigt, die das jeweilige Färbeverhalten eines Markers am besten repräsentieren.

Die mittels Excel Tabelle erfassten Daten wurden in das Statistikprogramm SPSS konvertiert und statistisch ausgewertet, und zwar hinsichtlich der Patientencharakteristik und dem Follow Up, der unterschiedlichen Expression der einzelnen Marker in gesundem und erkranktem Urothel sowie dem krebspezifischen Überleben - zum einen in Bezug auf klinische und histopathologische Parameter und zum anderen auf die unterschiedlichen Markerexpressionen. Die Überlebenskurven ab der Zeit nach radikaler Zystektomie wurden mittels Kaplan-Meier Methode erstellt.

Zum Vergleich der Überlebenskurven wurde der Log-Rank-Test angewandt, das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die Patientencharakteristik und das Follow Up erläutert. Danach folgt eine Beschreibung der Auswirkungen klinischer und histopathologischer Parameter auf das krebsspezifische Überleben (CSS). Anschließend wird auf die Marker E-Cadherin, N-Cadherin, β -Catenin, γ -Catenin, TIMP1 und FGFR3 einzeln eingegangen, und zwar beginnend mit einer Beschreibung des mikroskopischen Färbeverhaltens des jeweiligen Tumormarkers: die Markerexpression in gesundem und erkranktem Gewebe wird jeweils tabellarisch gegenübergestellt sowie mit Hilfe von Bildern einzelner Präparate erläutert. Diese deskriptive Expressionsanalyse soll einen Überblick über das Färbeverhalten der einzelnen Marker in gesundem sowie in erkranktem Gewebe geben. An die deskriptive Expressionsanalyse schließt jeweils die statistische Analyse der Markerexpression in Bezug auf das CSS an.

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Deskriptive Patientencharakteristik und Follow Up

In der folgenden Tabelle sind einige relevante Untersuchungsparameter der Patienten aufgelistet. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf das Gesamtkollektiv (n gesamt =146), vereinzelt fehlende Patientendaten wurden nicht mit aufgelistet.

<u>Parameter</u>	<u>Ergebnis</u>
Alter - Minimum / Maximum - median (IQR interquartile range)	40 / 84 Jahre 69 Jahre (63 - 76 Jahre)
Geschlecht - männlich - weiblich	121 (82,9%) 25 (17,1%)
BMI (Body Mass Index), n = 141 - minimum / maximum - median (IQR interquartile range)	18 / 71 kg/m ² 27,31 kg/m ² (24,32 - 29,84 kg/m ²)
ECOG-Status (Eastern Cooperative Oncology Group, Index zur Lebensqualität) - Grad 0 - Grad 1 - Grad 2 - Grad 3	54 (37,0 %) 67 (45,9 %) 22 (15,1 %) 1 (0,7 %)
ASA-Risikoklassifikation (American Society of Anesthesiologists) - ASA 1 - ASA 2 - ASA 3	37 (25,3 %) 49 (33,6 %) 57 (39,0 %)
Raucherstatus - Nichtraucher - ehemaliger Raucher - Raucher	62 (42,5 %) 31 (21,2 %) 38 (26,0 %)
pathologischer Tumorstatus pT - pTa - pTis - pT1 - pT2 - pT3 - pT4	2 (1,4 %) 13 (8,9 %) 17 (11,6 %) 26 (17,8 %) 61 (41,8 %) 27 (18,5 %)

pathologischer Lymphknotenstatus pN	
- pN0	89 (61,0 %)
- pN1	24 (16,4 %)
- pN2	33 (22,6%)
Metastasen cM	
- cM0	139 (95,2 %)
- cM1	7 (4,8 %)
Metastasierung	
- nein	106 (72,6 %)
- ja	40 (27,4 %)
R-Status	
- R0	122 (83,6 %)
- R1	21 (14,4 %)
- R2	3 (2,1 %)
assoziiertes CIS	
- kein CIS	68 (46,6 %)
- CIS	78 (53,4 %)
Harnableitung	
- Ileumconduit	74 (50,7 %)
- Indiana-Pouch	7 (4,8 %)
- Ileumneoblase	62 (42,5 %)
- Ureterokutaneostomie	3 (2,1 %)
Gesamtüberleben (OS)	
- lebt	74 (50,7 %)
- verstorben	72 (49,3 %)
Krebsspezifisches Überleben (CSS)	
- lebt oder nicht tumorbedingt verstorben	102 (69,9 %)
- tumorbedingt verstorben	44 (30,1 %)
maximale Follow Up Zeit ab Zystektomie	141 Monate
mediane Follow Up Zeit (IQR) ab Zystektomie	
- krebsspezifisches Überleben CSS	23,5 Monate (9,8 – 49,5 Monate)
- rezidivfreies Überleben RFS	18,0 Monate (7,0 – 47,3 Monate)

Rezidiv (lokal und systemisch)	
- kein Rezidiv	93 (63,7 %)
- Tumorrezidiv im Follow-up-Zeitraum	53 (36,3 %)
Lokalrezidiv	
- nein	123 (84,2 %)
- ja	23 (15,8 %)

Tabelle 6: relevante Patientendaten und Untersuchungskriterien

Die mediane Follow Up Zeit der Patienten bezüglich des krebsspezifischen Überlebens beträgt 23,5 Monate (IQR 9,8 – 49,5 Monate). Von den 146 Patienten mit radikaler Zystektomie wurden nach pathologischer Begutachtung 2 als Stadium pTa diagnostiziert, 13 als pTis, 17 als T1, 26 als T2, 61 als T3 und 27 als T4. Insgesamt sind 44 (30,1 %) der 146 Patienten tumorbedingt verstorben, davon keiner mit Stadium pTa, 2 mit pTis, 3 mit pT1, 4 mit pT2, 25 mit pT3 und 10 Patienten mit pT4.

3.1.2 Auswirkungen klinischer und histopathologischer Parameter auf das krebsspezifische Überleben (CSS)

Um den Einfluss der unterschiedlichen klinischen und histopathologischen Parameter auf das CSS zu untersuchen, wurde für einzelne Positionen eine Kaplan-Meier-Kurve berechnet.

Abbildung 7 stellt den Einfluss des Geschlechtes auf das CSS dar:

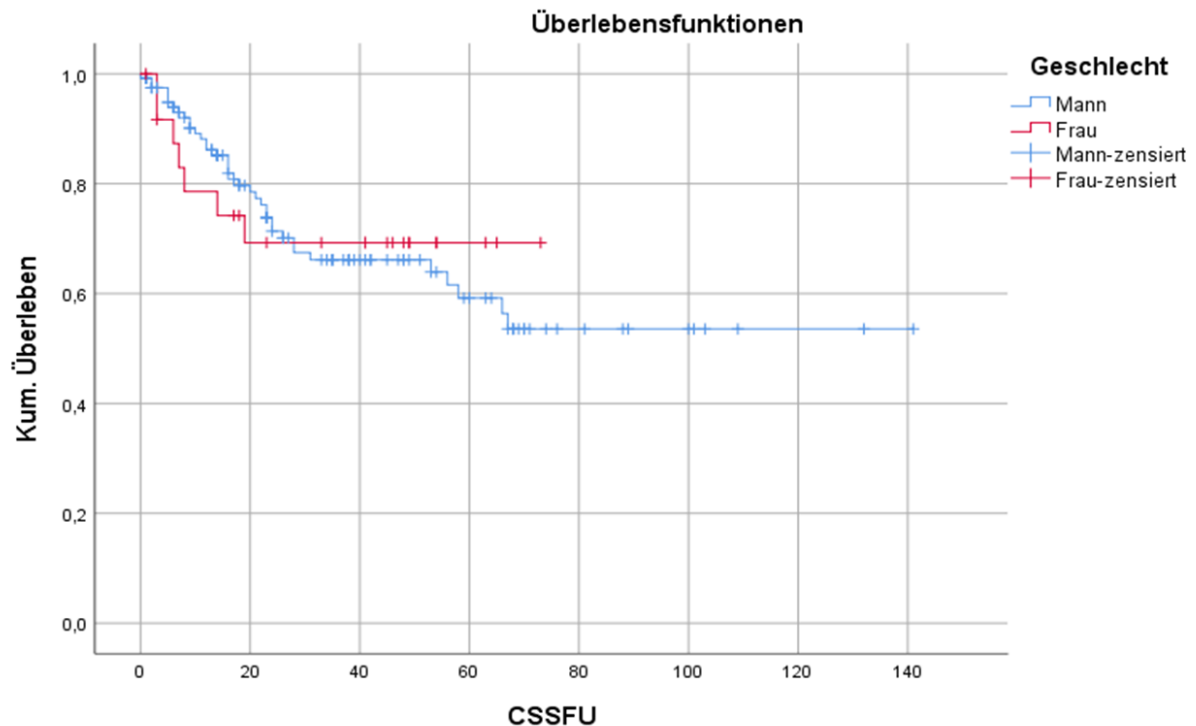


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung von Männern und Frauen mit Urothelkarzinom der Harnblase nach radikaler Zystektomie

Von den 121 Männern starben 37 an den Folgen des Harnblasenkarzinoms (30,6 %), von den 25 Frauen 7 (28,0 %). Die Abbildung zeigt, dass Männer ein schlechteres krebsspezifisches Überleben aufweisen als Frauen: nach 60 Monaten sind knapp 70% der Frauen, jedoch nur noch ca. 60% der Männer am Leben bzw. nicht am Tumor verstorben. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,936 nicht signifikant für den Unterschied im Überleben der unterschiedlichen Geschlechter.

Abbildung 8 veranschaulicht die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich der unterschiedlichen ECOG-Stadien:

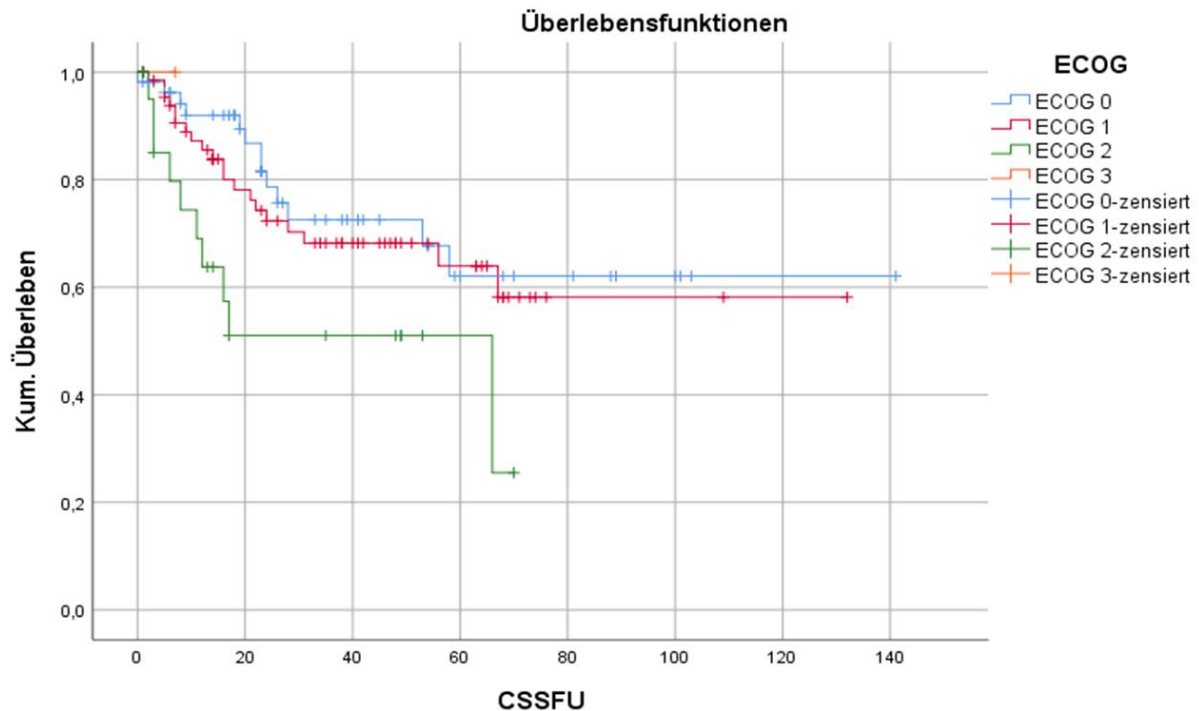


Abbildung 8: Unterschiedliche krebspezifische Überlebensverteilung der verschiedenen ECOG-Stadien

Nach 50 Monaten ab radikaler Zystektomie sind ca. 72,5% der Patienten ohne Einschränkung der physischen Aktivität (ECOG 0) noch am Leben bzw. nicht am Tumor verstorben, gegenüber ca. 67,5% der Patienten mit Stadium ECOG 1, also Patienten mit Einschränkungen bei körperlicher Belastung. Lediglich 50% der Patienten mit erfasstem ECOG-Stadium 2 sind nach 50 Monaten noch am Leben. Der einzige erfasste Patient mit ECOG-Stadium 3 ist zwar verstorben, aber nicht aufgrund des Harnblasenkarzinoms. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass sich eine Tendenz eines schlechteren CSS bei höherem ECOG-Stadium abzeichnet. Der mittels Log-Rank-Test ermittelte p-Wert betrug 0,066 und zeigte sich somit nicht statistisch signifikant für den Unterschied im Überleben der verschiedenen ECOG-Stadien.

Abbildung 9 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen ASA-Stadien 1 bis 3 des Patientenkollektivs auf das krebspezifische Überleben:

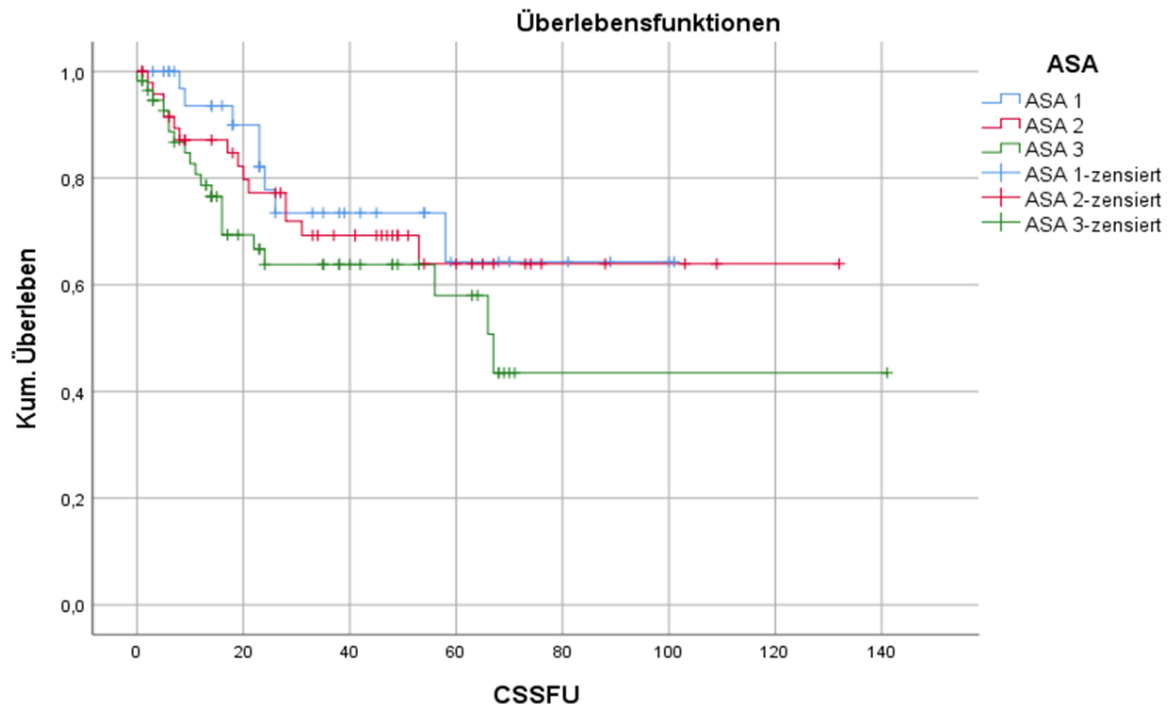


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung der ASA-Stadien 1-3

Auch hier lässt sich ablesen, dass das ASA-Stadium negativ mit dem krebsspezifischen Überleben korreliert: nach 50 Monaten sind ca. 75 % der Patienten mit ASA-Stadium 1, 70% der Patienten mit ASA-Stadium 2 und ca. 64 % mit ASA-Stadium 2 am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Ab einer Follow-Up-Zeit von knapp 70 Monaten gleichen sich die Überlebenskurven von Patienten mit ASA-Stadium 1 und 2 an: nach 100 Monaten sind 64 % der ASA 1 und 2 Patienten noch am Leben bzw. nicht am Tumor verstorben gegenüber ca. 43 % der ASA 3 Patienten. Der Log-Rank-Test zeigte sich allerdings auch hier mit einem p-Wert von 0,218 statistisch nicht signifikant für den Unterschied der unterschiedlichen Überlebensverteilungen.

Abbildung 10 demonstriert den Einfluss des Rauchens auf das krebsspezifische Überleben im untersuchten Patientenkollektiv:

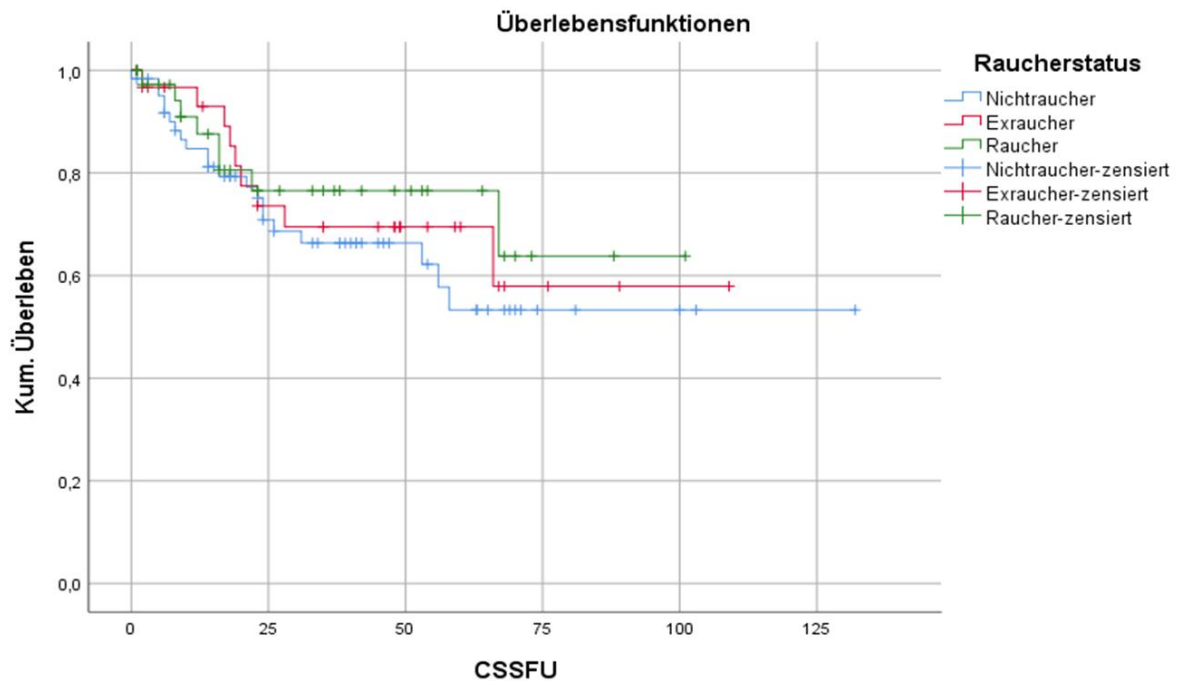


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf den Raucherstatus

Von 131 Patienten war der Raucherstatus bekannt. Nach 50 Monaten sind ca. 77% der aktiven Raucher, ca. 70% der ehemaligen Raucher und ca. 67% der Nichtraucher am Leben bzw. nicht tumorbedingt verstorben. Insgesamt zeigt sich somit eine paradoxe Tendenz, dass das Rauchen eher mit einer besseren krebspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht. Der Log-Rank-Test zeigte sich hier jedoch mit einem p-Wert von 0,623 nicht signifikant für den Unterschied im Überleben bezüglich des Raucherstatus.

Abbildung 11 veranschaulicht das krebspezifische Überleben hinsichtlich der unterschiedlichen pT-Stadien:

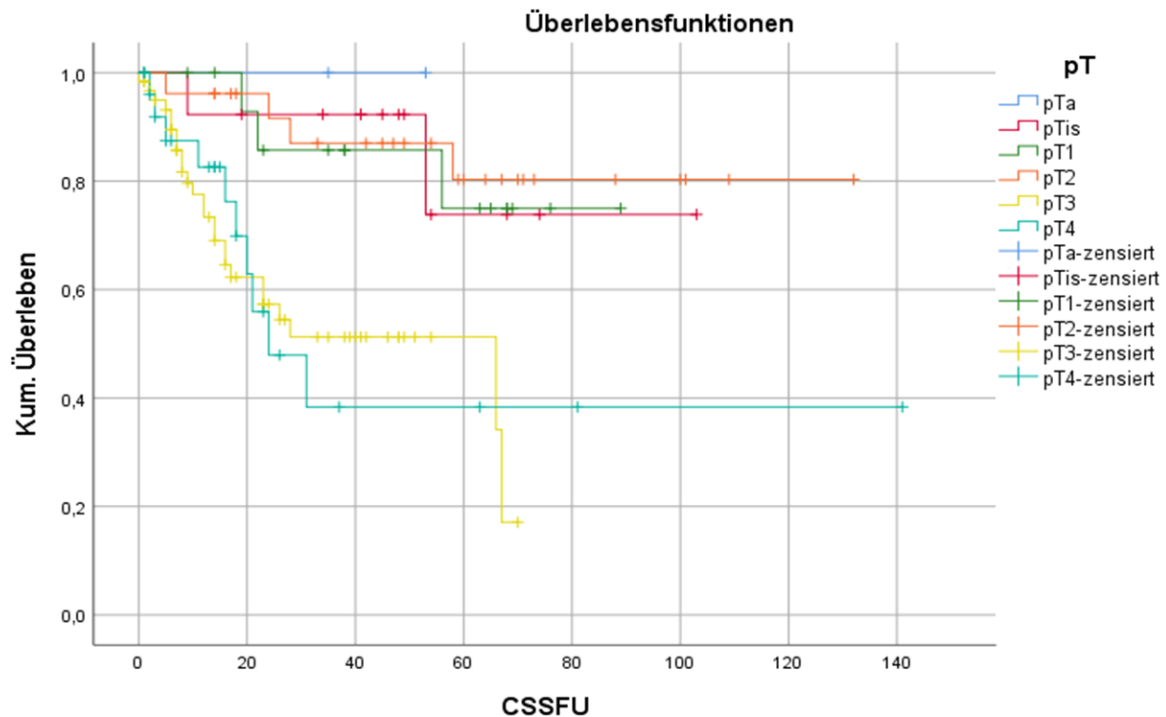


Abbildung 11: Unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung der verschiedenen pT-Stadien

Mit 50 Follow-up Monaten sind alle Patienten (100%) mit Stadium pTa am Leben bzw. nicht am Tumor verstorben, gefolgt von ca. 92% Überlebenden mit initialem Stadium pTis sowie ca. 87% der Patienten mit Stadium pT2 und ca. 86% mit Stadium pT1. Stadium pT3 und pT4 zeigen nach 50 Monaten deutlich geringere Überlebenswahrscheinlichkeiten: Ca. 52% der Patienten mit pT3 und ca. 38% der Patienten im Stadium pT4 sind nach 50 Monaten noch am Leben bzw. nicht am Tumor verstorben. Insgesamt ist also festzuhalten, dass im untersuchten Kollektiv ein höheres pT-Stadium mit schlechterer krebsspezifischer Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist, wobei ab pT3 eine deutlich schlechtere Prognose zu erwarten ist. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,0004 deutlich signifikant für den Unterschied im Überleben der verschiedenen pT-Stadien.

Abbildung 12 stellt die unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf das pN-Stadium dar:

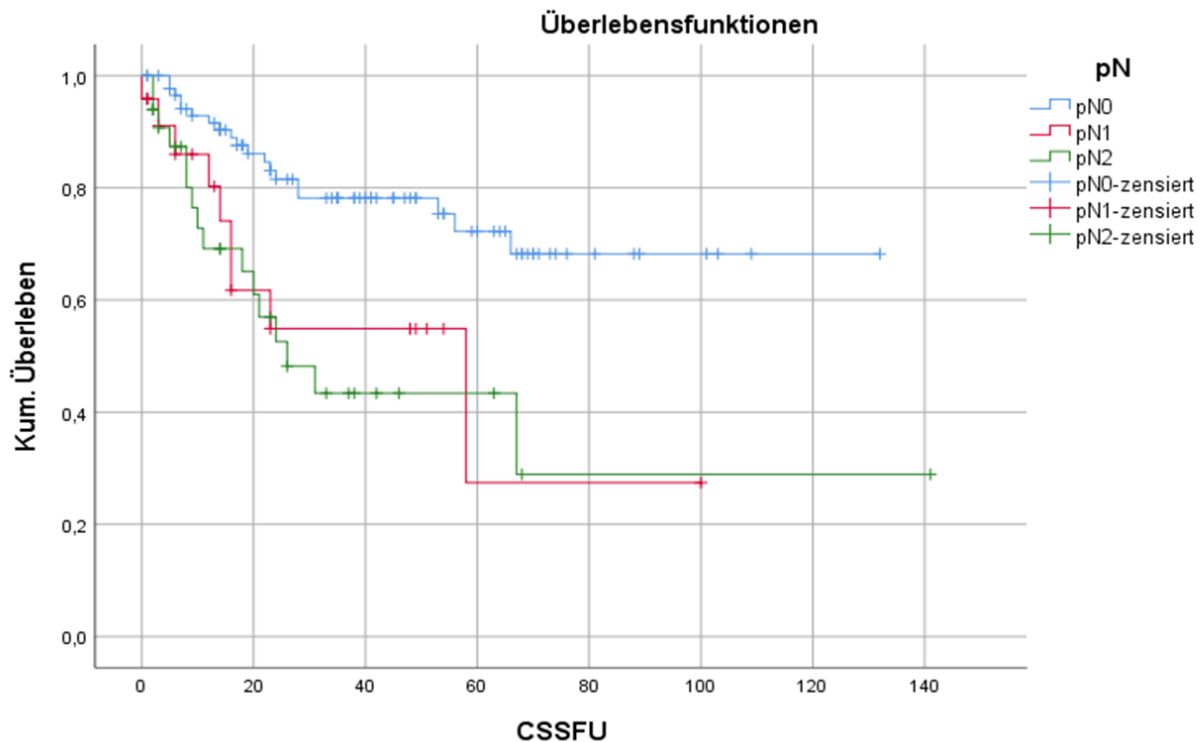


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche Überlebensverteilung in Bezug auf den pN-Status

Demnach sind nach 50 Follow Up Monaten ca. 78% der Patienten mit pN0 gegenüber ca. 55% der Patienten mit pN1 und ca. 43% der Patienten mit pN2 am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Ab ca. 70 Monaten gleichen sich die Kurven für pN1 und pN2 in etwa an, so sind nach 100 Monaten ca. 68% der Patienten mit pN0 gegenüber 30% mit pN2 und 29% mit pN1 noch am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass ein positiver N-Status deutlich assoziiert ist mit schlechterer krebsspezifischer Überlebenswahrscheinlichkeit. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,001 deutliche statistische Signifikanz für den Unterschied in den Überlebenswahrscheinlichkeiten.

Abbildung 13 veranschaulicht den Einfluss des Vorhandenseins von Metastasen auf das krebsspezifische Überleben:

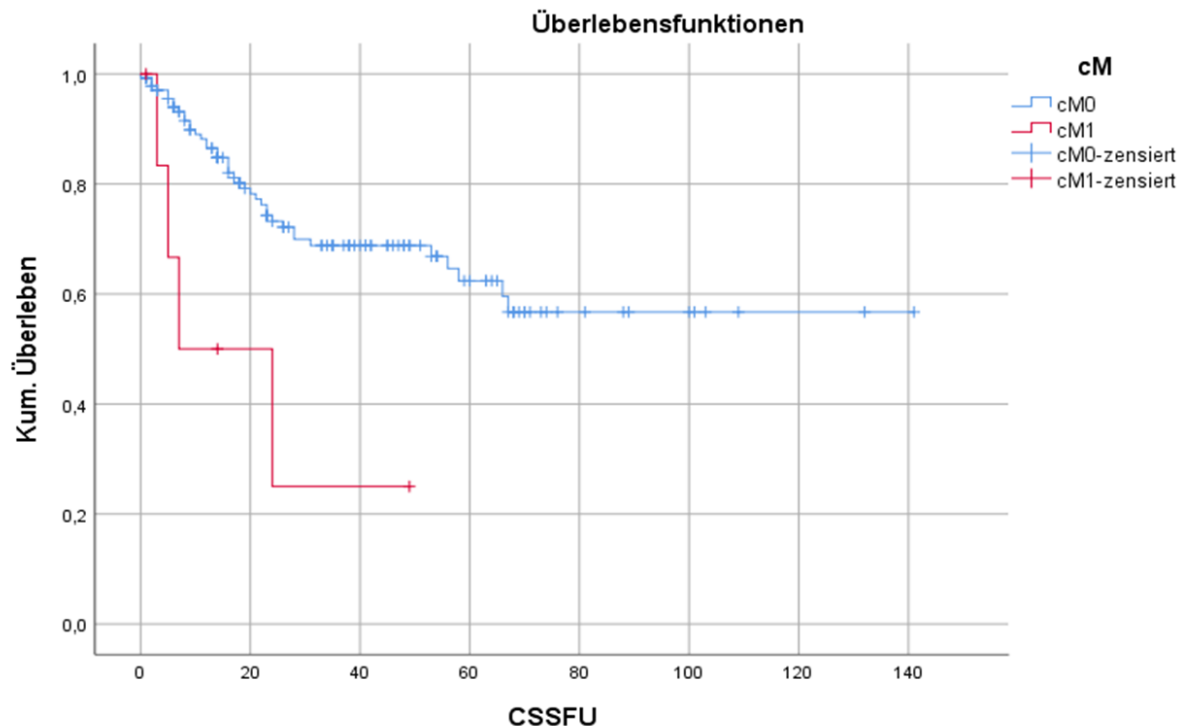


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich des Vorhandenseins von Metastasen im CT

Das Vorhandensein von Metastasen ist insgesamt deutlich assoziiert mit einer schlechteren krebspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit: nach 50 Monaten sind ca. 70% der Patienten ohne Metastasen gegenüber 25% der Patienten mit Metastasen am Leben oder nicht karzinombedingt verstorben. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,005 signifikant für den Unterschied in den Überlebenswahrscheinlichkeiten hinsichtlich des Metastasenstatus.

Nachfolgende Abbildung 14 zeigt den Einfluss eines gleichzeitig vorhandenen Carcinoma in situ im Tumorpräparat auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit:

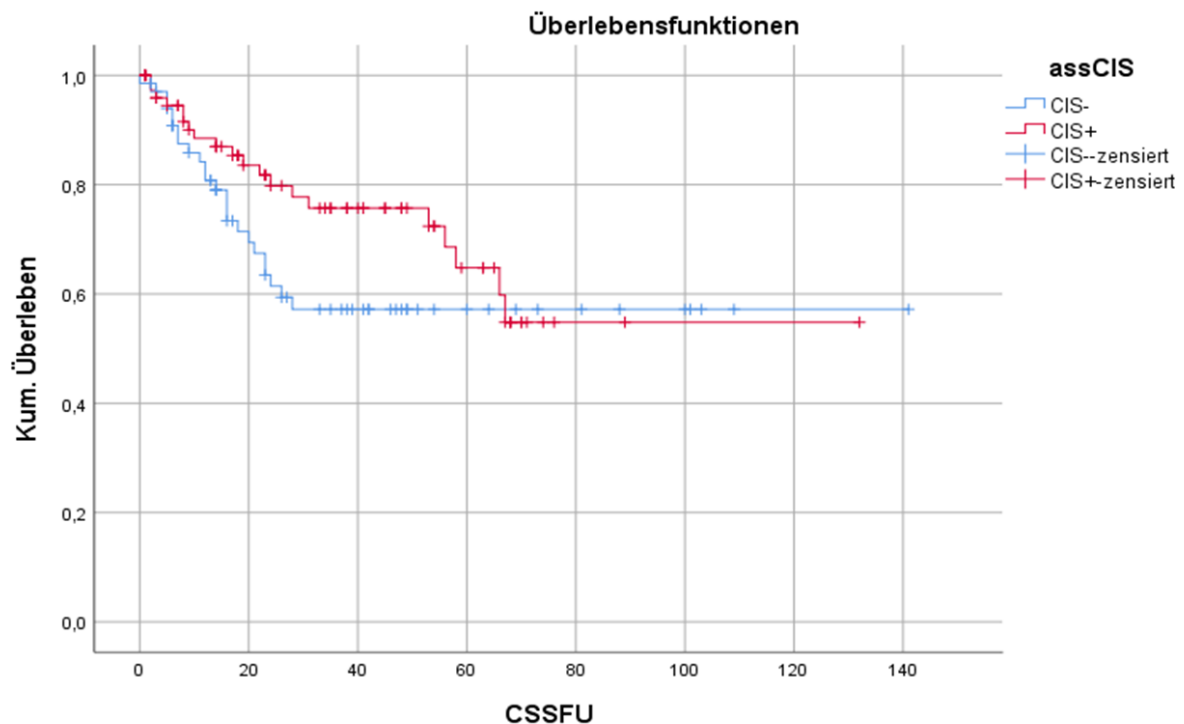


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf ein assoziiertes Carcinoma in situ (CIS)

Mit 50 Monaten Follow Up sind ca. 76% der Patienten mit assoziiertem CIS gegenüber ca. 58% ohne assoziiertem CIS am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Ab 52 Monaten sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit der CIS-positiven Patienten knapp unter die Überlebenskurve der Patienten mit negativem CIS-Status: demnach sind ab ca. 70 Monaten Follow Up weiterhin ca. 58% der Patienten ohne assoziiertem CIS und ca. 56% der Patienten mit assoziiertem CIS am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Im Vergleich haben also - langfristig gesehen - Patienten mit assoziiertem CIS eine minimal geringere Überlebenswahrscheinlichkeit. Der Log-Rank-Test zeigte sich allerdings mit einem p-Wert von 0,164 nicht signifikant für den Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich eines positiven oder negativen CIS-Status.

Abbildung 15 spiegelt den Einfluss des Resektionsstatus nach radikaler Zystektomie auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit wieder:

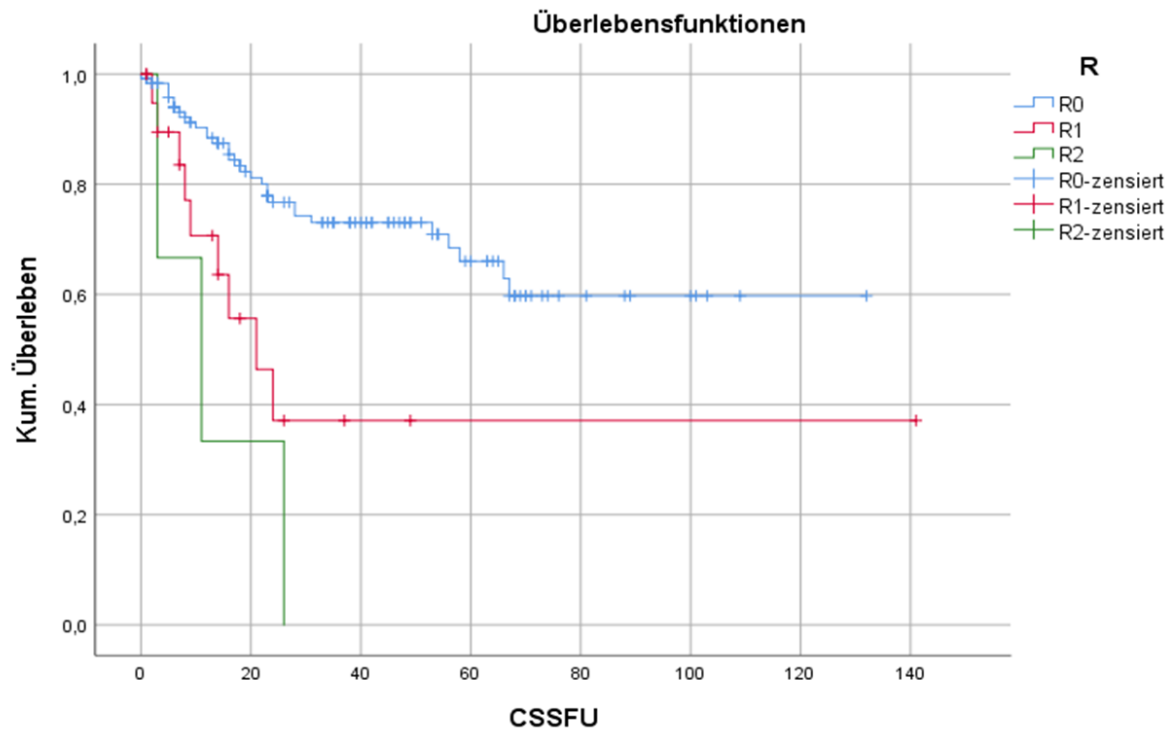


Abbildung 15: Unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf den Resektionsstatus

Die Abbildung zeigt insgesamt eine negative Korrelation zwischen R-Status und krebsspezifischer Überlebenswahrscheinlichkeit: je höher der R-Status, desto schlechter die Überlebenswahrscheinlichkeit. So sind nach ca. 25 Monaten ca. 77% mit R0, ca. 38% mit R1 und ca. 32% der Patienten mit Status R2 am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Der Log-Rank-Test zeigte mit einem p-Wert von 0,00005 deutliche Signifikanz für den Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich der unterschiedlichen Resektionsstufen.

Abbildung 16 stellt die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich der verschiedenartigen postoperativen Harnableitungen dar:

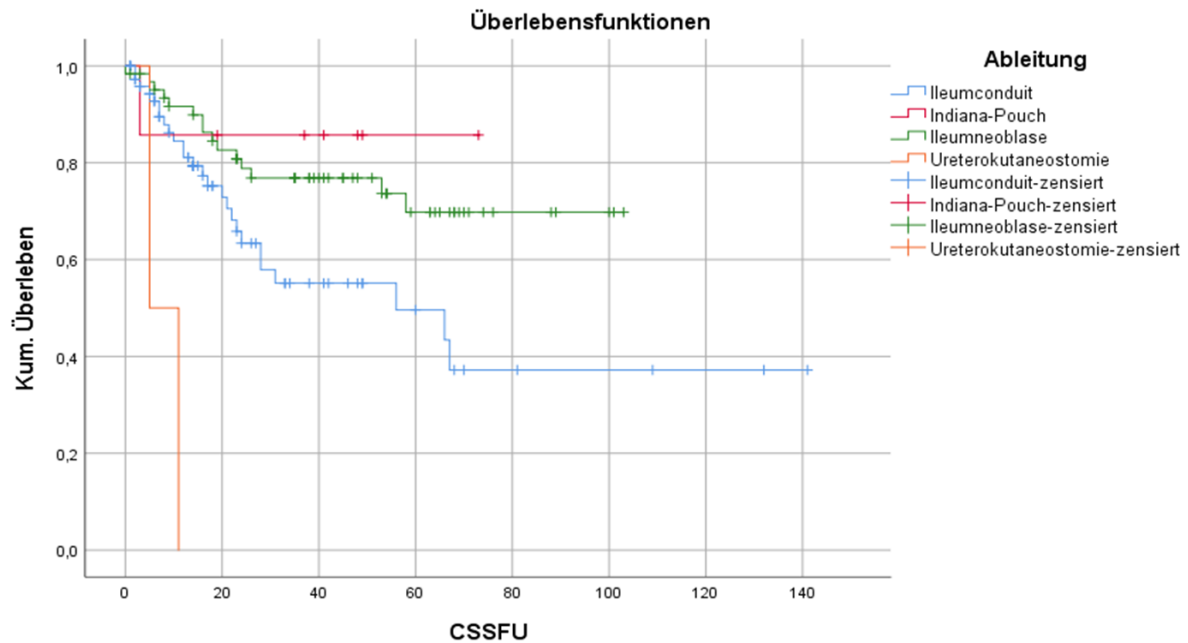


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich der verschiedenen postoperativen Harnableitungen

Nach ca. 50 Monaten sind ca. 86% mit Indiana-Pouch, ca. 78% mit Ileumneoblase und ca. 55% der Patienten mit Ileumconduit am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Das krebspezifische Follow Up der zwei Patienten mit postoperativ angelegter Ureterokutaneostomie endet bereits nach ca. 10 Monaten. Die beste krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit im untersuchten Patientenkollektiv haben demnach also Patienten mit postoperativ angelegtem Indiana-Pouch, gefolgt von Ileumneoblase und Ileumconduit. Die geringste krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen Patienten mit Ureterokutaneostomie. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von unter 0,00004 deutlich signifikant für den Unterschied der unterschiedlichen Überlebenskurven.

Abbildung 17 veranschaulicht den Einfluss des Auftretens eines Lokalrezidivs auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit:

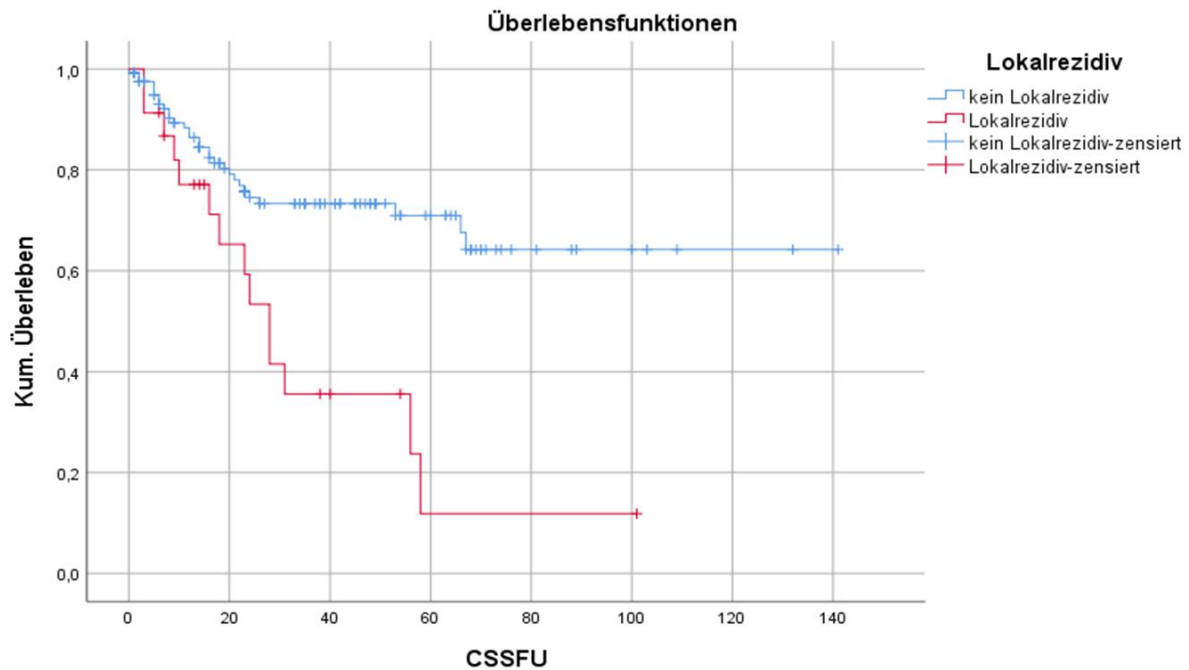


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich des Auftretens eines Lokalrezidivs

Es zeigt sich insgesamt eine deutlich schlechtere krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit nach dem Auftreten eines Lokalrezidivs: nach ca. 80 Monaten sind ca. 64% der Patienten ohne Lokalrezidiv versus ca. 12% der Patienten mit Lokalrezidiv am Leben bzw. nicht tumorbedingt verstorben. Der Log-Rank-Test ergab auch hier mit einem p-Wert von unter 0,001 deutliche statistische Signifikanz.

Abbildung 18 verdeutlicht die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich eines positiven oder negativen Metastasenstatus:

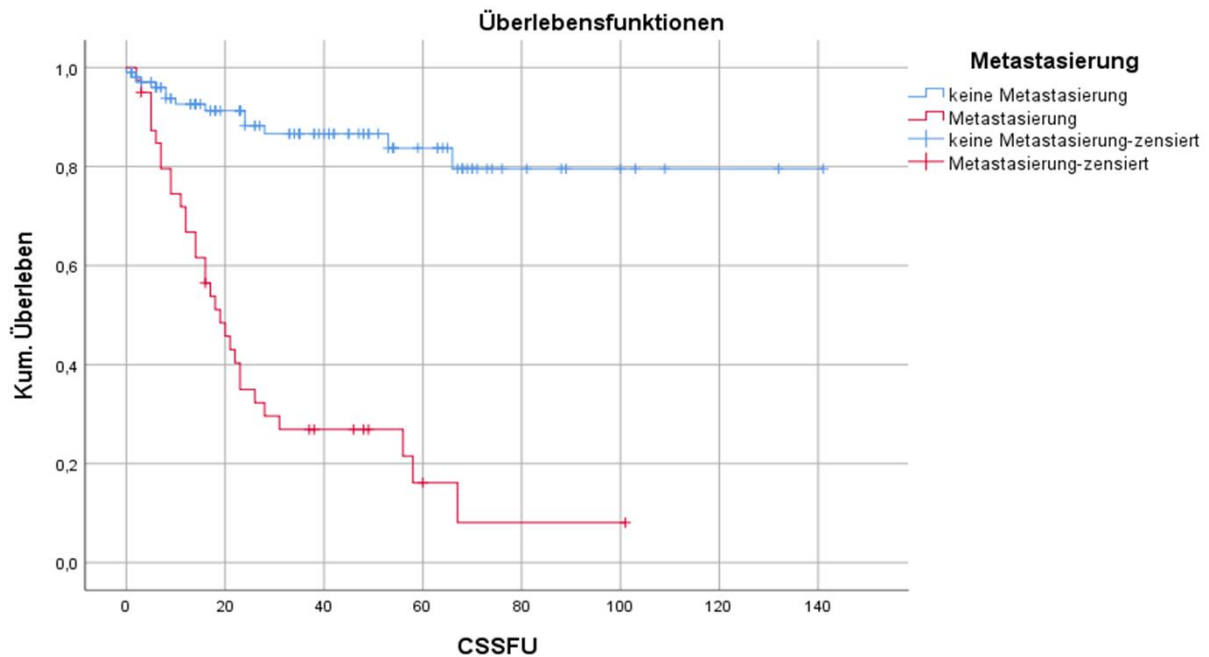


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich des Metastasenstatus

Das Vorhandensein von Metastasen ist insgesamt deutlich assoziiert mit einer schlechteren krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit: nach ca. 80 Monaten sind noch ca. 80% der Patienten mit negativem versus nur mehr 9% der Patienten mit positivem Metastasenstatus am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Der Log-Rank-Test ergab auch hier mit einem p-Wert von unter 0,0001 deutliche statistische Signifikanz.

3.2 E-Cadherin

3.2.1 Deskriptive Expressionsanalyse

Abbildung 19 zeigt, wie sich histologisch die E-Cadherin-Expression in angrenzendem normalem Urothel überwiegend darstellte, Abbildung 20 und 21 geben einen Eindruck der Expression in Tumorgewebe.

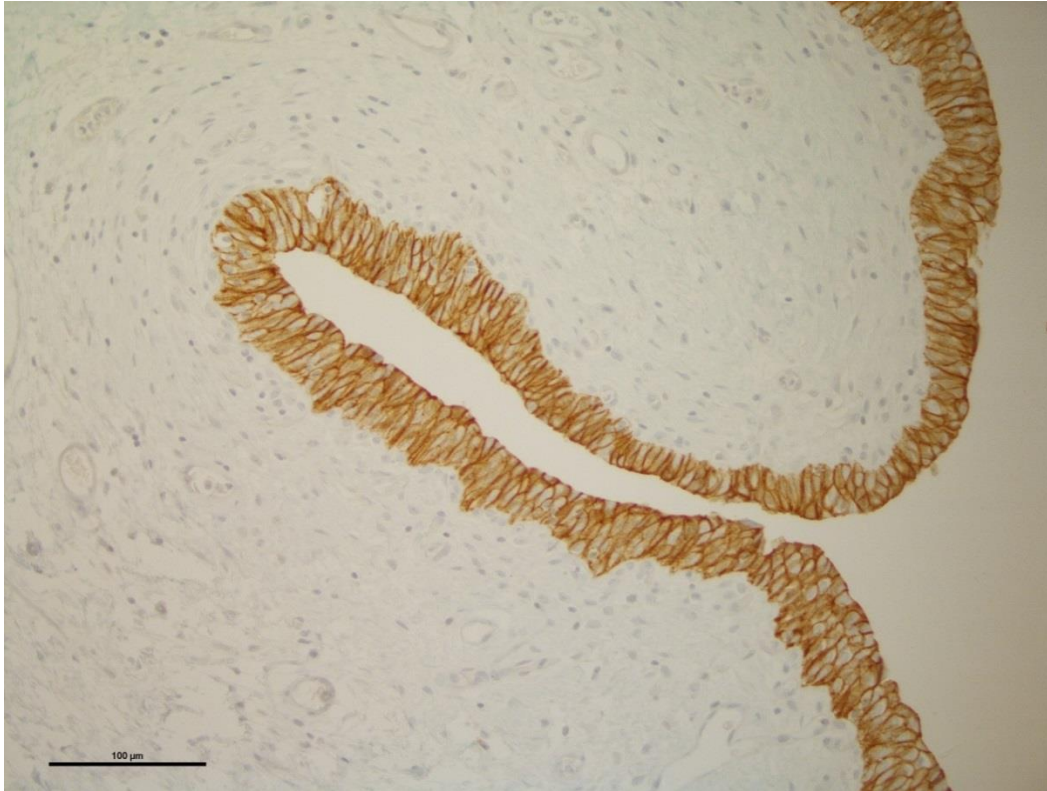


Abbildung 19: E-Cadherin-Expression in normalem Urothel, hier stark membranär und leicht zytoplasmatisch bei gleichmäßig betonter Färbung aller Urothelschichten

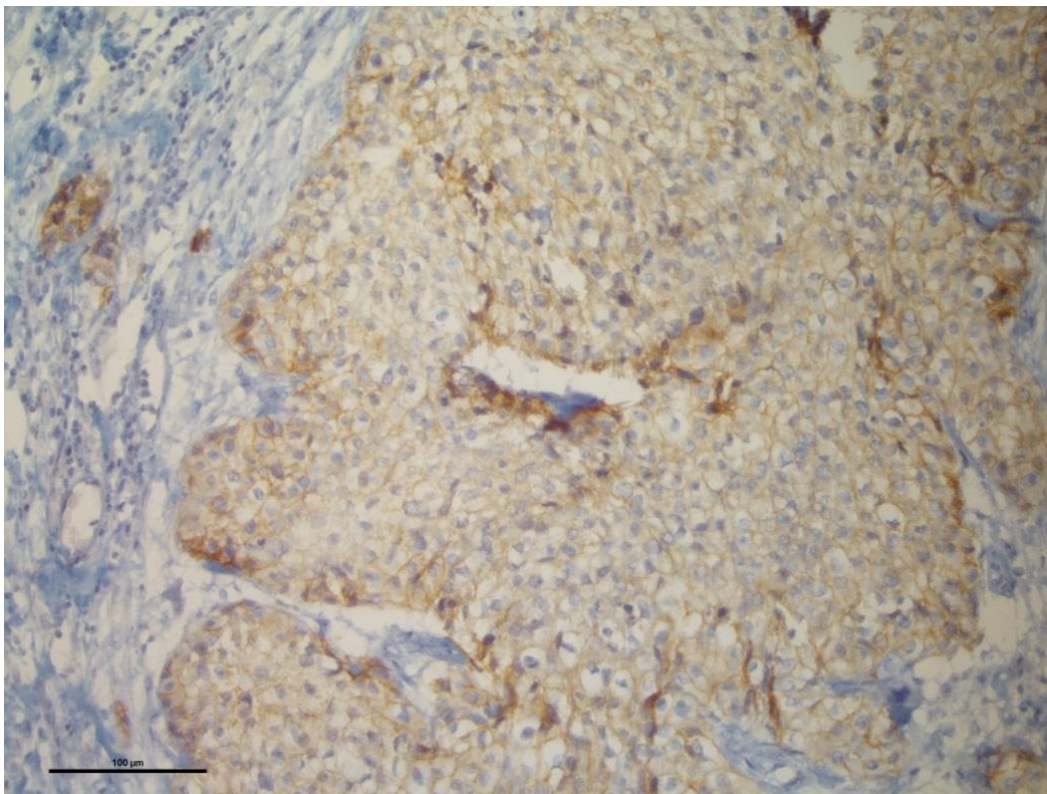


Abbildung 20: überwiegend leicht membranäre E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe

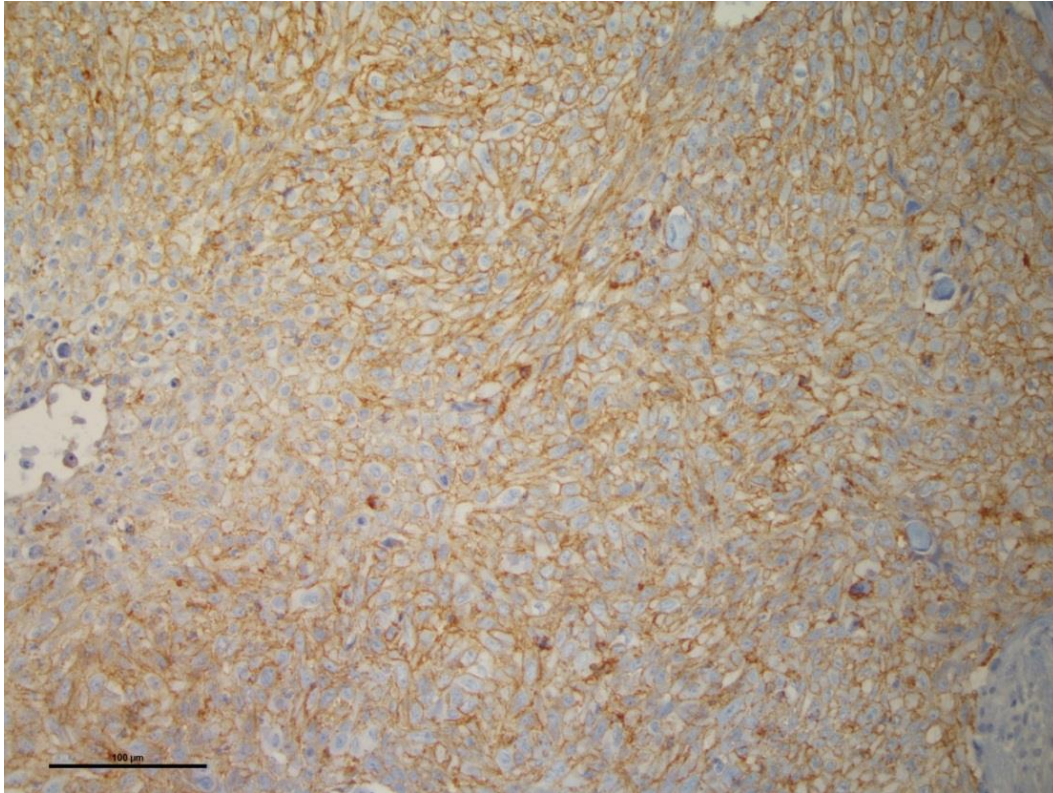


Abbildung 21: mäßig membranäre E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe

Tabelle 7 gibt einen Überblick über den Anteil der E-Cadherin-Expression der Präparate in normalem versus erkranktem Gewebe. Es sei darauf hingewiesen, dass die Nachkommastellen folgender Tabellen auf ganze Zahlen aufgerundet sind und sich jeweils auf die Anzahl der vorhandenen Präparate mit normalem Urothel (n = 130) bzw. mit Tumorgewebe (n = 92) beziehen.

E-Cadherin	<u>normales Urothel</u>	<u>Tumorgewebe</u>
nukleär	0%	0%
zytoplasmatisch	51%	7%
membranär	100%	84%
• stark	18%	1%
• mäßig	48%	45%
• schwach	35%	38%

Tabelle 7: Gegenüberstellung der E-Cadherin Färbung in normalem versus erkranktem Gewebe

In den 130 Präparaten mit gesundem Urothel erwies sich die Färbung immer als membranär (davon 18% stark, 48% mäßig, 35% schwach), manchmal leicht zytoplasmatisch (51%), aber nie nukleär.

Von den 92 Tumorpräparaten wiesen nur 7% der Tumorpräparate zytoplasmatische Färbung auf (vs. 51% in gesundem Urothel). 84% der Tumorpräparate waren membranär gefärbt (davon 1% stark, 45% mäßig, 35% schwach).

Vergleicht man die ermittelten Werte von gesundem Urothel mit Tumorgewebe, lässt sich insgesamt ein Verlust E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe feststellen, insbesondere ein Verlust der zytoplasmatischen Expression. Dies unterstützt die Aussage, dass ein Verlust von E-Cadherin ein charakteristisches Zeichen der EMT ist und einen bedeutenden Schritt in der Karzinogenese darstellt (66–68).

Nachfolgende Tabelle 8 zeigt die Verteilung des Markers in normalem Urothel:

E-Cadherin Verteilung	
oberflächlich	23%
verteilt	62%
basal	15%

Tabelle 8: Dominierendes Färbeverhalten von E-Cadherin in normalem Urothel

Es lagen sowohl Präparate mit betonter Anfärbung der superfizialen Schicht vor (23%), als auch ausschließlich basal gefärbtes Urothel (15%). In den meisten Fällen zeigte sich die Färbung allerdings über alle Schichten gleich verteilt und eine Färbedominanz war nicht erkennbar (62%).

3.2.2 Auswirkung der E-Cadherin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)

Abbildung 22 veranschaulicht die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich oberflächlicher, verteilter und basaler E-Cadherin-Expression in normalem Urothel:

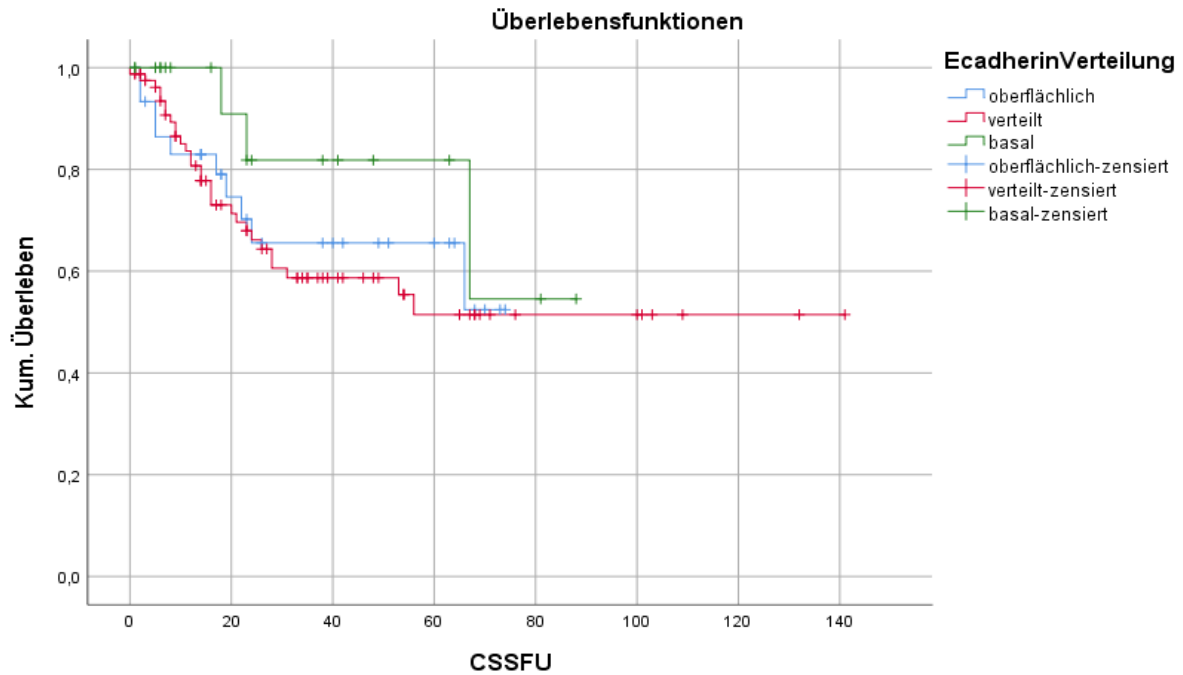


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für die krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche E-Cadherin-Verteilung in gesundem Urothel

Mit 50 Monaten Follow Up sind ca. 81% der Patienten mit basal betonter Färbung im Präparat gegenüber ca. 66% mit oberflächlicher und ca. 59% mit verteilter Färbung am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Ab knapp 70 Monaten gleichen sich die Überlebenskurven aller 3 Gruppen auf ca. 50-55% an. Somit zeigt sich allenfalls eine Tendenz, dass anfänglich (bis knapp 70 Monate Follow Up) Patienten mit basal betonter urothelialer Färbung eine bessere krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit oberflächlicher und verteilter urothelialer E-Cadherin-Verteilung haben. Das Signifikanzniveau zeigt sich hier allerdings mit einem p-Wert von 0,42 nicht signifikant, ein Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich basaler, verteilter oder superfizialer Färbung ist somit unwahrscheinlich - die E-Cadherin-Verteilung in gesundem Urothel eignet sich somit nicht als Prognosefaktor.

Abbildung 23 spiegelt den Einfluss positiver oder negativer zytoplasmatischer Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit wieder:

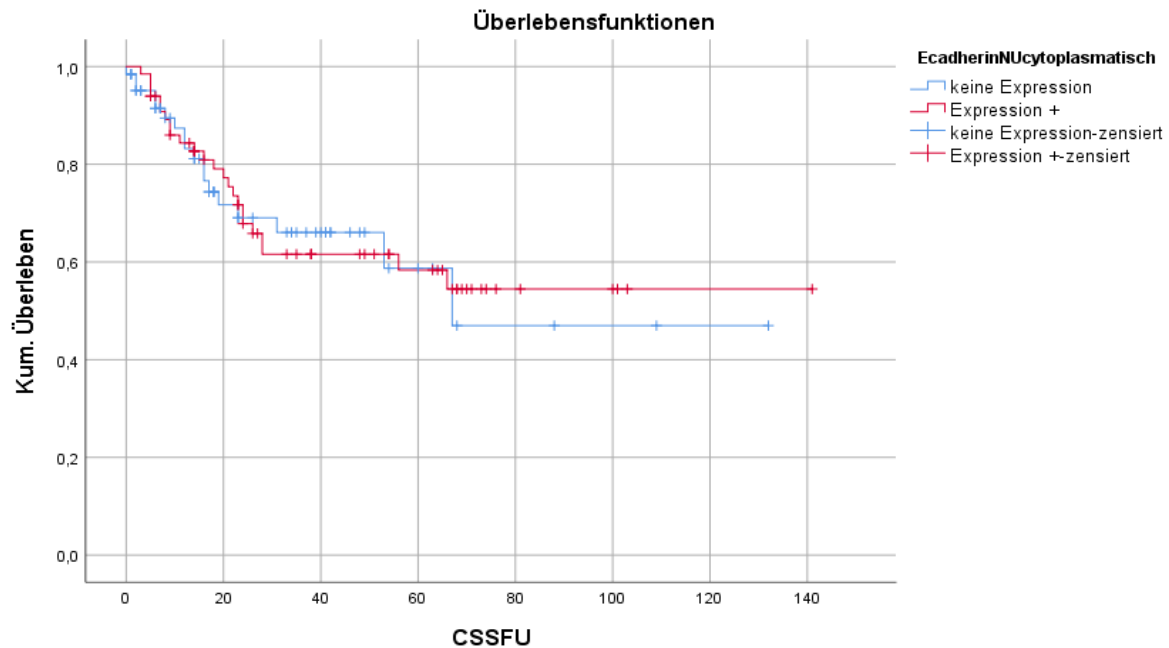


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische E-Cadherin-Expression in gesundem Urothel

Mit ca. 50 Monaten sind ca. 66% der Patienten mit negativer E-Cadherin-Expression in normalem Urothel versus ca. 61% der Patienten mit positiver Expression am Leben. Nach gut 65 Monaten schneiden sich die Kurven der Überlebenswahrscheinlichkeiten, nun sind ca. 55% der Patienten mit positiver Expression und 47% der Patienten mit negativer Expression am Leben. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,90 nicht signifikant für den Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich positiver oder negativer zytoplasmatischer Expression in normalem Urothel.

Längerfristig gesehen zeigen somit Patienten mit positiver zytoplasmatischer E-Cadherin-Expression in normalem Urothel allenfalls eine gering bessere (um ca. 8%), jedoch statistisch nicht signifikante Überlebenswahrscheinlichkeit. Als prognostischer Marker ist die zytoplasmatische E-Cadherin-Expression in normalem Urothel allerdings eher ungeeignet.

Abbildung 24 stellt den Einfluss positiver versus negativer zytoplasmatischer E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

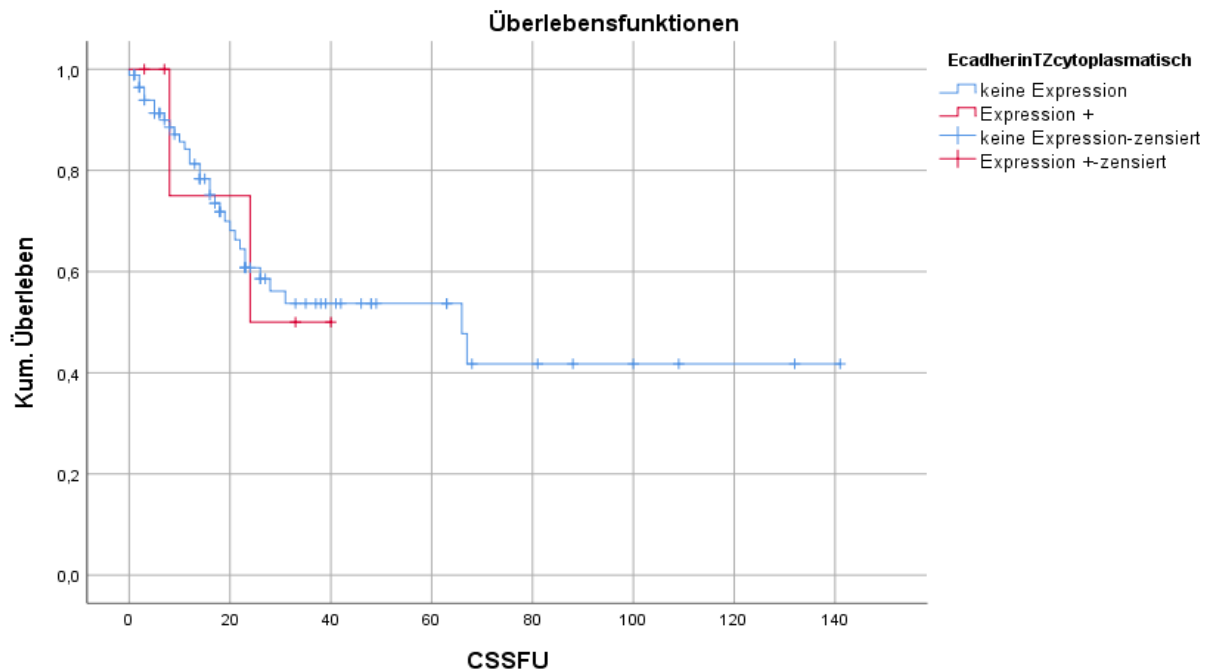


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die zytoplasmatische E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe

Bei ca. 40 Monaten krebsspezifischem Follow Up sind ca. 54% der Patienten mit negativer zytoplasmatischer E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe versus ca. 50% der Patienten mit positiver E-Cadherin-Expression am Leben. Nach 40 Monaten endet die Follow Up Zeit für Patienten mit positiver Expression. Der Log-Rank-Test erwies sich mit einem p-Wert von 0,987 als statistisch eindeutig nicht signifikant. Als prognostischer Marker ist die zytoplasmatische E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe daher ebenfalls ungeeignet.

Abbildung 25 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer E-Cadherin-Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

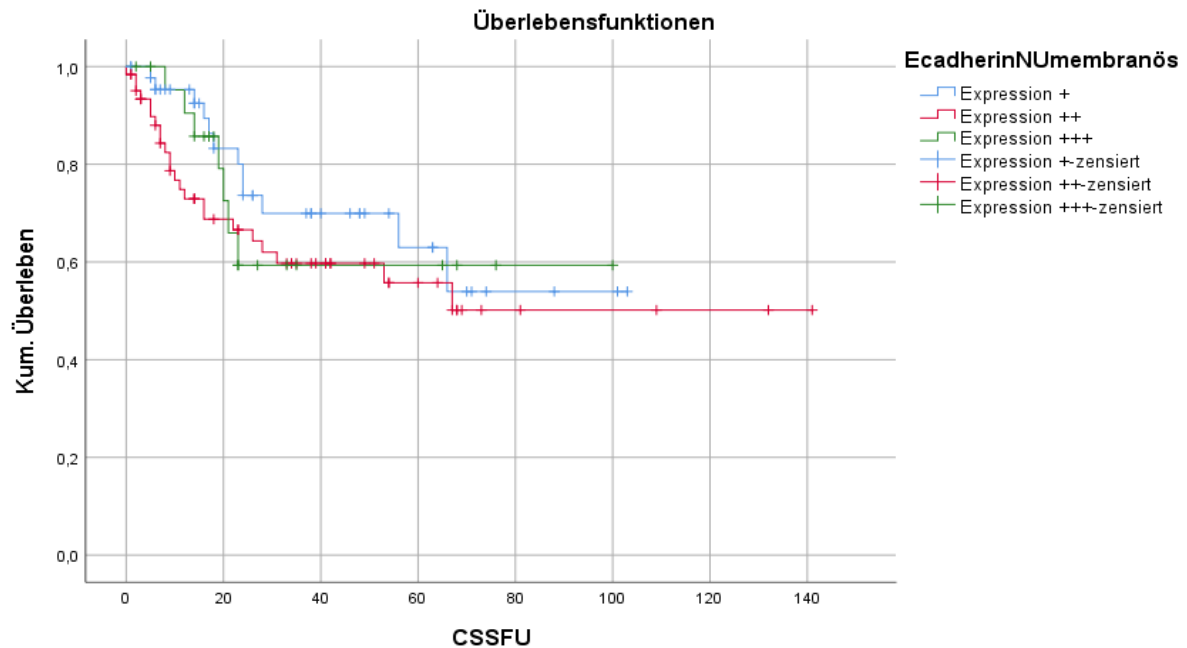


Abbildung 25: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre E-Cadherin-Expression in normalem Urothel

Nach 50 Monaten sind ca. 70% der Patienten mit schwacher membranärer E-Cadherin-Expression in normalem Urothel wahrscheinlich noch am Leben versus 60% der Patienten mit mäßiger und starker Expression. Ab ca. 66 Monaten Follow Up liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei knapp 60% der Patienten mit starker Expression versus ca. 54% der Patienten mit schwacher und 50% mit mäßiger E-Cadherin-Expression. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,458, eine statistische Signifikanz ist somit nicht gegeben. Die membranäre E-Cadherin-Expressionsstärke in normalem Urothel ist somit nicht zur Vorhersage des onkologischen Verlaufs geeignet.

Abbildung 26 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

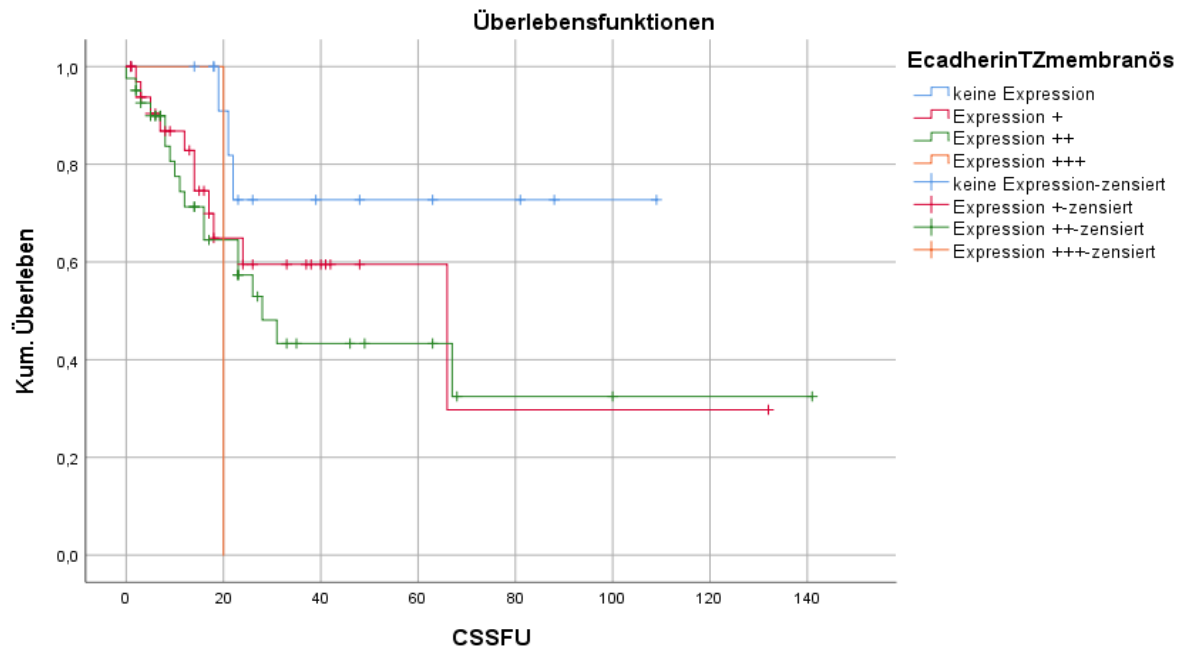


Abbildung 26: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe

In Tumorgewebe zeigen nach 50 Monaten die Patienten mit negativer E-Cadherin-Expression eine krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 73%, diejenigen mit leichter Expression von ca. 60% sowie jene mit mäßiger Expression von ca. 43%. Bei den Patienten mit starker positiver E-Cadherin-Expression endet die Follow-up-Zeit bereits mit ca. 20 Monaten. Nach gut 65 Monaten gleichen sich die Überlebenskurven der leichten und mäßigen E-Cadherin-Expression in etwa an: es sind ca. 30-33% der Patienten mit leichter und mäßiger E-Cadherin-Expression wahrscheinlich am Leben versus 73% der Patienten ohne E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe. Der Log-Rank-Test zeigte sich hier ebenfalls mit einem p-Wert von 0,182 nicht signifikant für den Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich der unterschiedlichen Stärke der membranären E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe. Zusammenfassend kann somit bei der membranären E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe eine Tendenz gezeigt werden, dass eine negative Expression mit einer besseren krebspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht bzw. eine positive E-Cadherin-Expression mit schlechterem krebspezifischem Überleben, allerdings liegt dieses Ergebnis ebenfalls deutlich über dem Signifikanzniveau von 5% – somit ist die membranäre E-Cadherin-

Expressionsstärke in Tumorgewebe ebenfalls kein geeigneter Marker zur Vorhersage des onkologischen Verlaufs.

3.3 N-Cadherin

3.3.1 Deskriptive Expressionsanalyse

Im Allgemeinen wirkte bei der mikroskopischen Auswertung die N-Cadherin-Anfärbbarkeit stärker und deutlicher als die E-Cadherin-Färbung. In Normalgewebe fanden sich neben der Expressierung im Urothel auch teilweise Bereiche im Muskelgewebe, die leicht zytoplasmatisch angefärbte Zellen zeigten, sowie Bereiche im Bindegewebe, die vereinzelt Zellen (am ehesten Lymphozyten) mit mäßiger zytoplasmatischer Färbung aufwiesen.

Abbildung 27 zeigt die histologische N-Cadherin-Expression in gesundem Urothel, Abbildung 28 wiederum in Tumorgewebe.

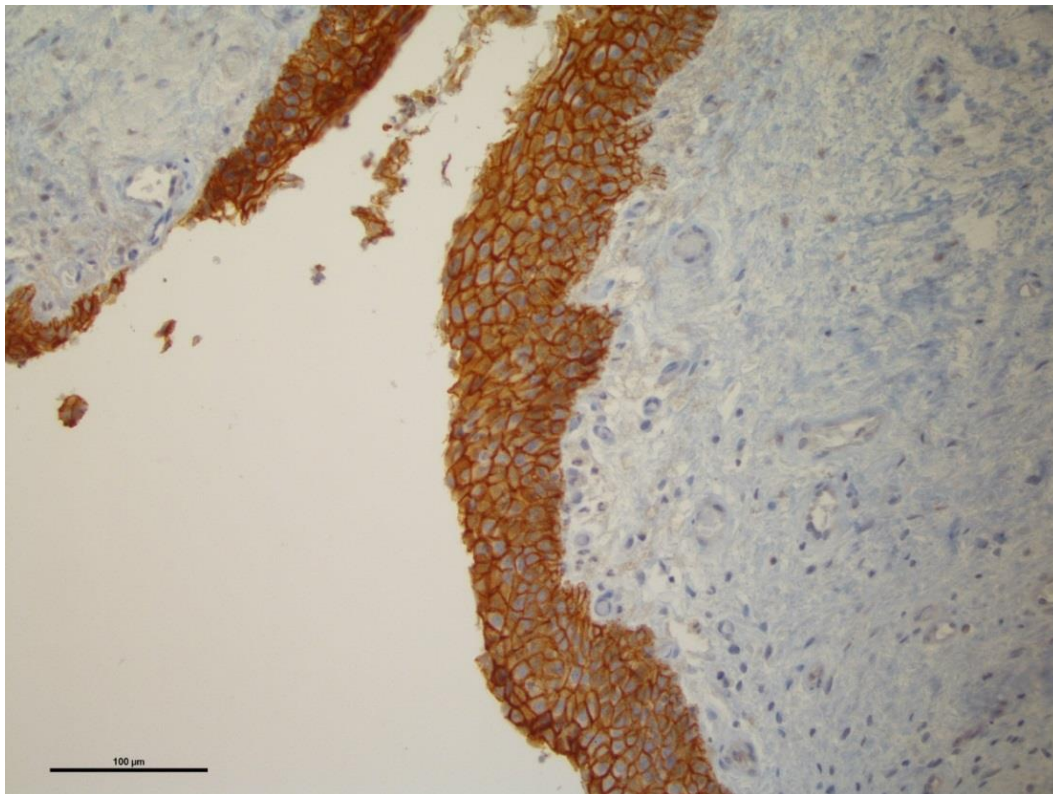


Abbildung 27: N-Cadherin-Expression in normalem Urothel, hier stark membranär und leicht zytoplasmatisch

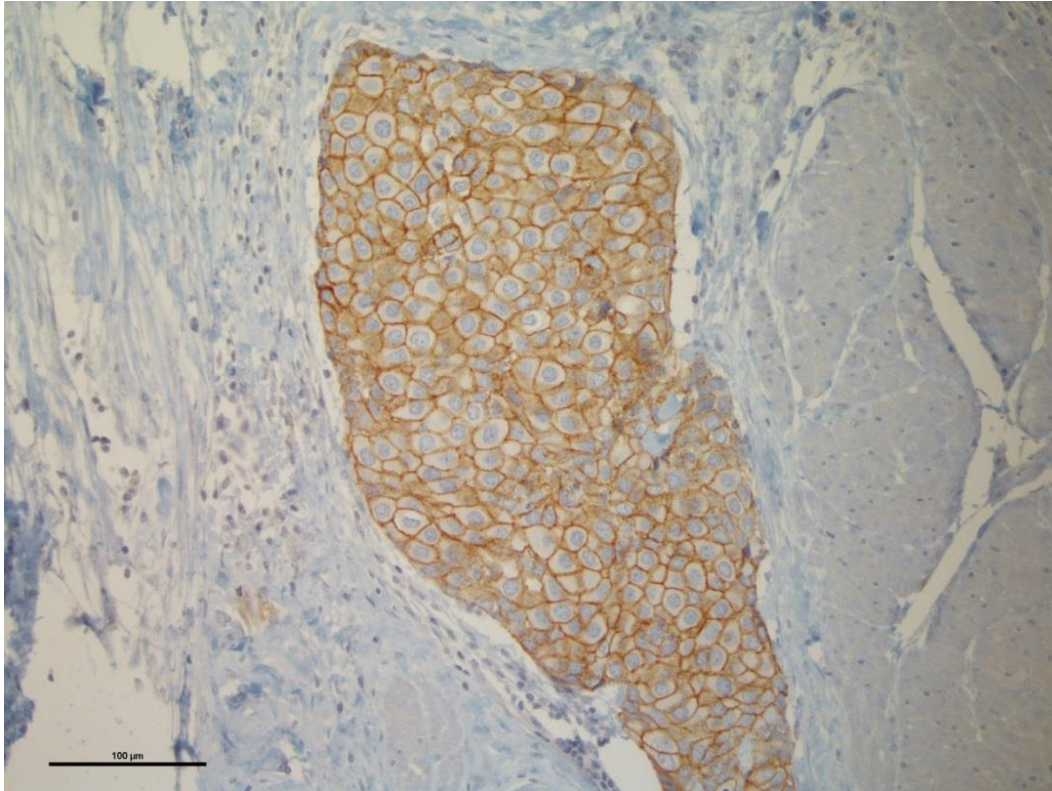


Abbildung 28: mäßig membranäre N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die N-Cadherin-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe:

N-Cadherin	<u>normales Urothel</u>	<u>Tumorgewebe</u>
nukleär	0%	0%
zytoplasmatisch	47%	21%
membranär	100%	91%
• stark	57%	7%
• mäßig	41%	59%
• schwach	2%	25%

Tabelle 9: Gegenüberstellung der N-Cadherin-Expression in normalem versus erkranktem Urothel

In den vorhandenen 130 Präparaten mit normalem Urothel färbten sich die Zellen immer membranär (57% stark, 41% mäßig, 2% schwach), manchmal leicht zytoplasmatisch (47%), aber nie nukleär.

In den vorliegenden 92 Tumorpräparaten wiesen 21% der Tumorpräparate zytoplasmatische Färbung auf, 91% der Tumorpräparate zeigten membranäre Färbung (7% stark, 59% mäßig und 25% schwach).

Ein Vergleich der N-Cadherin-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe zeigt also einen Rückgang der zytoplasmatischen Expression von N-Cadherin um 26% sowie einen Verlust der membranären Expression in Tumorgewebe um 9%. Gleichzeitig verliert die membranäre N-Cadherin-Expression deutlich an Stärke.

Dieses Ergebnis scheint gegensätzlich zu der Theorie des Cadherin-Switches zu stehen, bei der ein Rückgang der E-Cadherin-Expression mit einer erhöhten N-Cadherin- Expression einher geht (32,69).

Nachfolgende Tabelle 10 zeigt die Verteilung des Markers in normalem Urothel:

N-Cadherin Verteilung	
oberflächlich	20 %
verteilt	76%
basal	4 %

Tabelle 10: dominierendes Färbeverhalten von N-Cadherin in normalem Urothel

Es lagen sowohl Präparate mit betonter Anfärbung der superfizialen Schicht vor (20%), als auch basal betonte Färbung des Urothels (4%). In den meisten Fällen (76%) zeigte sich die Färbung allerdings über alle Schichten gleich verteilt und eine Färbedominanz war nicht erkennbar.

3.3.2 Auswirkung der N-Cadherin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)

Abbildung 29 veranschaulicht die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich oberflächlicher, verteilter und basaler N-Cadherin-Expression in normalem Urothel:

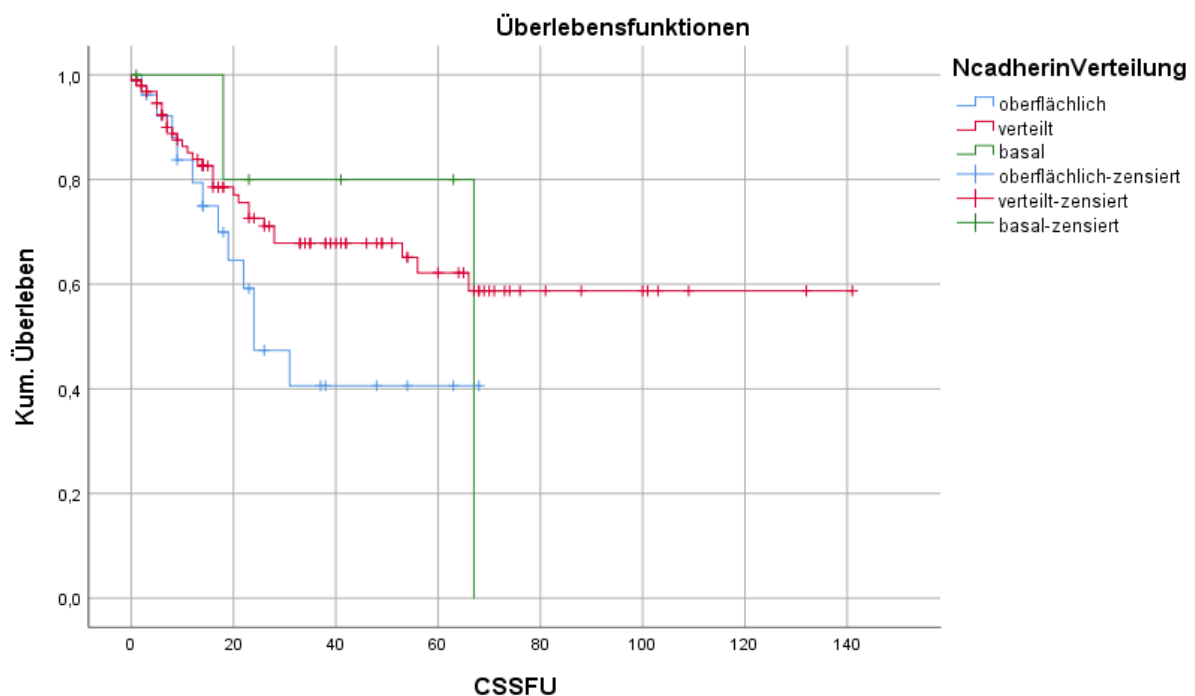


Abbildung 29: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche N-Cadherin-Verteilung in normalem Urothel

Nach 50 Monaten liegt die krebsspezifische Überlebensverteilung der Patienten mit basal betonter Färbung in normalem Urothel bei ca. 80%, bei Patienten mit verteilter Färbung bei ca. 68% und bei jenen mit oberflächlicher Verteilung bei ca. 40%. Somit geht wie bei E-Cadherin eine basal betonte Anfärbung in normalem Urothel mit besserem CCS als eine verteilte und eine oberflächliche Expression einher – der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,182 allerdings auch hier keine statistische Signifikanz, ein Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit ist hinsichtlich basaler, verteilter oder superfizialer Färbung somit statistisch

unwahrscheinlich - folglich scheint die N-Cadherin-Verteilung in gesundem Urothel ebenfalls kein vielversprechender Prognosefaktor zu sein.

Abbildung 30 spiegelt den Einfluss positiver oder negativer zytoplasmatischer N-Cadherin-Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit wieder:

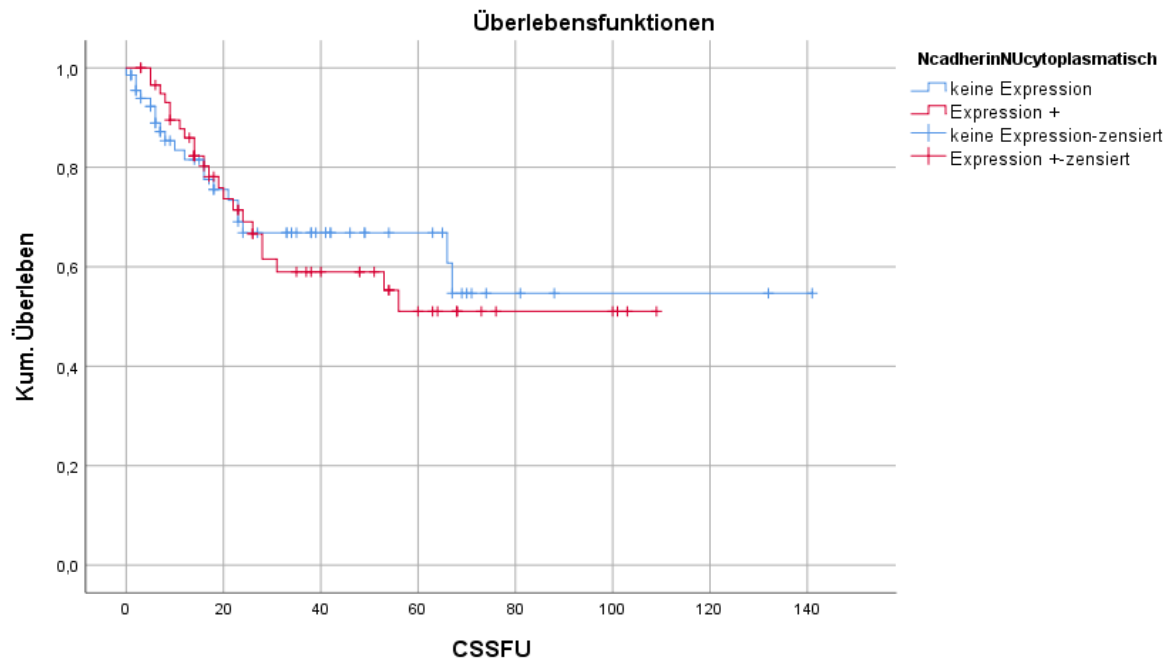


Abbildung 30: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische N-Cadherin-Expression in normalem Urothel

Nach 100 Monaten liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten ohne zytoplasmatische N-Cadherin-Expression in normalem Urothel bei ca. 55%, bei Patienten mit positiver Expression bei ca. 51%. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,764 nicht signifikant. Insgesamt zeigt sich somit ein statistisch nicht signifikantes, allenfalls gering besseres CCS bei negativer zytoplasmatischer N-Cadherin-Expression in normalem Urothel. Als zuverlässiger Prognosemarker ist die zytoplasmatische N-Cadherin in normalem Urothel bei fehlender Signifikanz jedoch ungeeignet.

Abbildung 31 stellt den Einfluss positiver versus negativer zytoplasmatischer N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

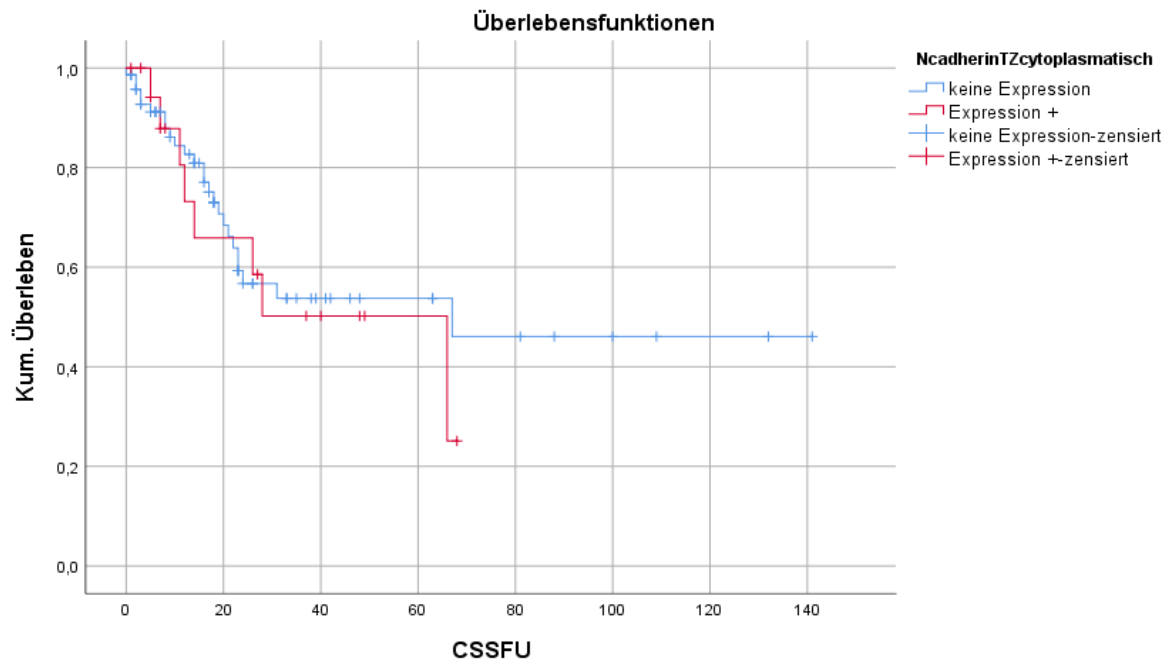


Abbildung 31: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe

Nach 50 Monaten zeigt die Überlebenskurve an, dass ca. 54% der Patienten mit negativer zytoplasmatischer N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe noch am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben sind versus ca. 50% der Patienten mit positiver N-Cadherin-Expression. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,662. Somit ist das Ergebnis statistisch nicht signifikant, als zuverlässiger Prognosemarker ist die zytoplasmatische N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe daher ebenfalls nicht zu sehen.

Abbildung 32 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer N-Cadherin-Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

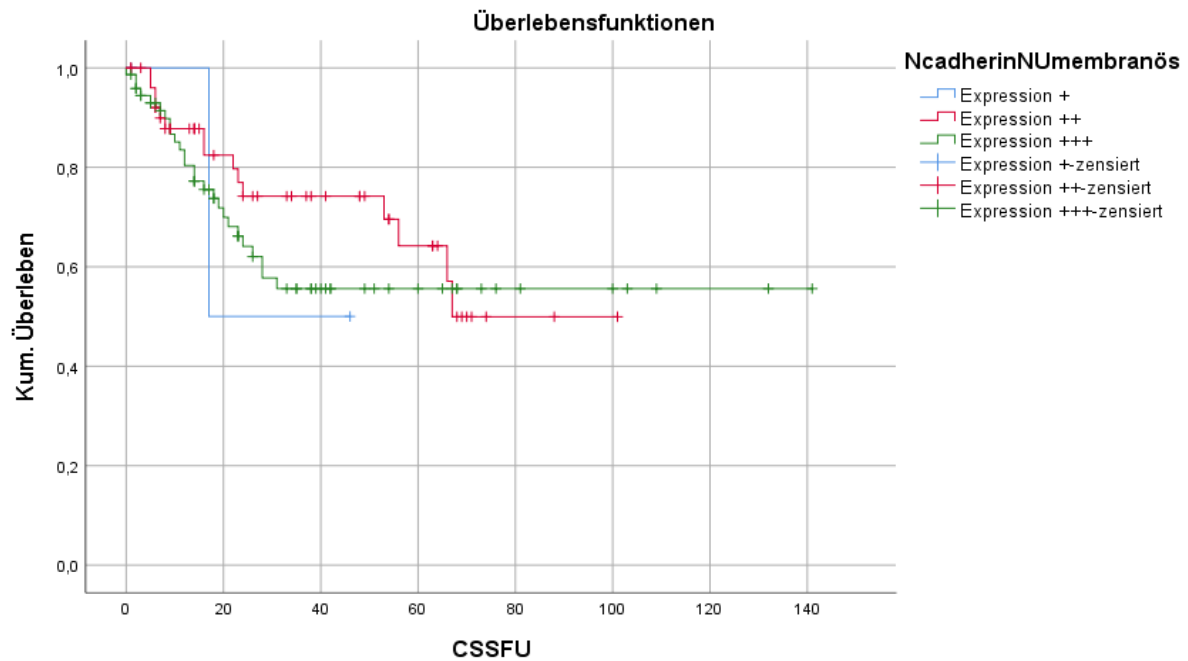


Abbildung 32: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre N-Cadherin-Expression in normalem Urothel

Nach knapp 50 Monaten sind ca. 75% der Patienten mit mäßiger versus ca. 55% mit starker und ca. 50% mit schwacher membranärer N-Cadherin-Expression in normalem Urothel am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Der Log-Rank-Test ist mit einem p-Wert von 0,621 nicht statistisch signifikant. Somit stellt die membranäre N-Cadherin-Expression in normalem Urothel ebenfalls keinen brauchbaren prognostischen Marker dar.

Abbildung 33 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

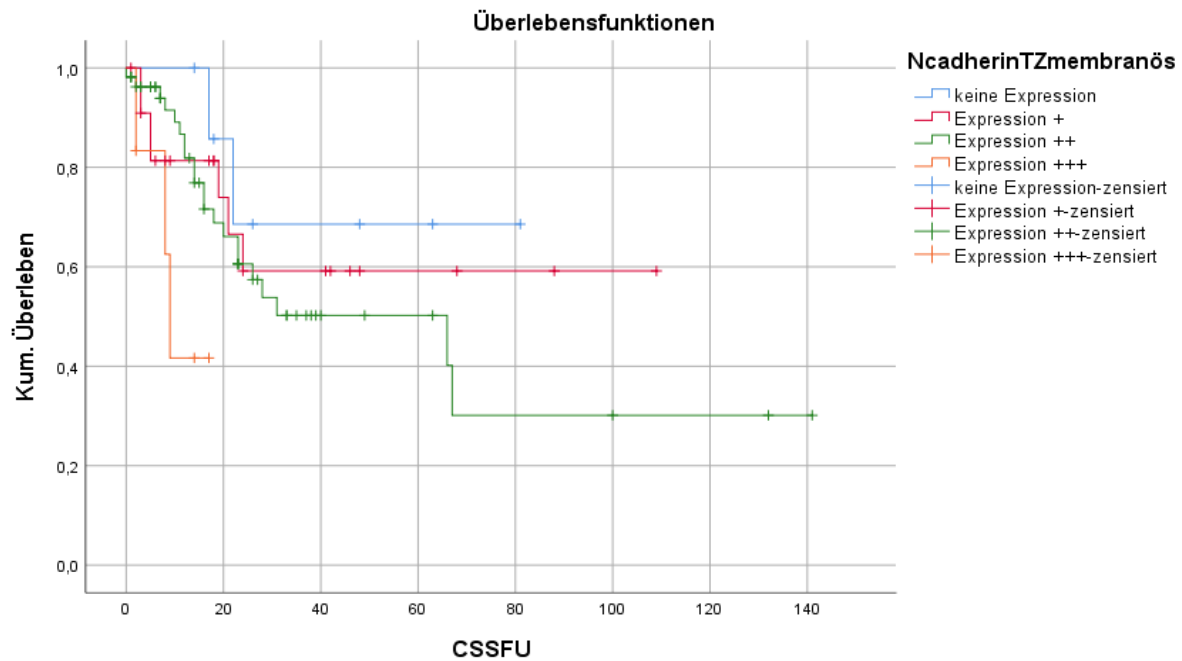


Abbildung 33: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe

Nach 50 Monaten sind ca. 70% der Patienten mit negativer membranäre N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben versus ca. 59% der Patienten mit schwacher und ca. 50% mit mäßiger membranärer N-Cadherin-Expression. Das krebspezifische Follow Up der Patienten mit starker membranärer N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe endet bereits mit ca. 18 Monaten, hier beträgt die Überlebenswahrscheinlichkeit in etwa 41%. Nach 100 Monaten sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit mäßiger Expression weiter auf ca. 30%. Der Log-Rank-Test erbringt einen p-Wert von 0,088, welcher annähernd statistisch signifikant ist.

Insgesamt zeigt sich also bei einem Signifikanzniveau von 8,8% möglicherweise eine bedeutende Assoziation zwischen N-Cadherin-Expression und CSS: je stärker die membranäre Expression in Tumorgewebe, desto schlechter die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit.

3.4 β -Catenin

3.4.1 Deskriptive Expressionsanalyse

Im Allgemeinen zeigte sich der Marker mikroskopisch eher schwach angefärbt. Neben der Expression in Urothel fand sich β -Catenin auch in Endothelzellen einiger Präparate. Die zytoplasmatische Färbung stellte sich oftmals nur extrem schwach dar, so dass sie in diesen Fällen als negativ gewertet wurde.

Abbildung 34 zeigt, wie sich die β -Catenin-Expression histologisch in normalem Urothel überwiegend darstellte, Abbildung 35 stellt die für Tumorgewebe typische Expression dar.

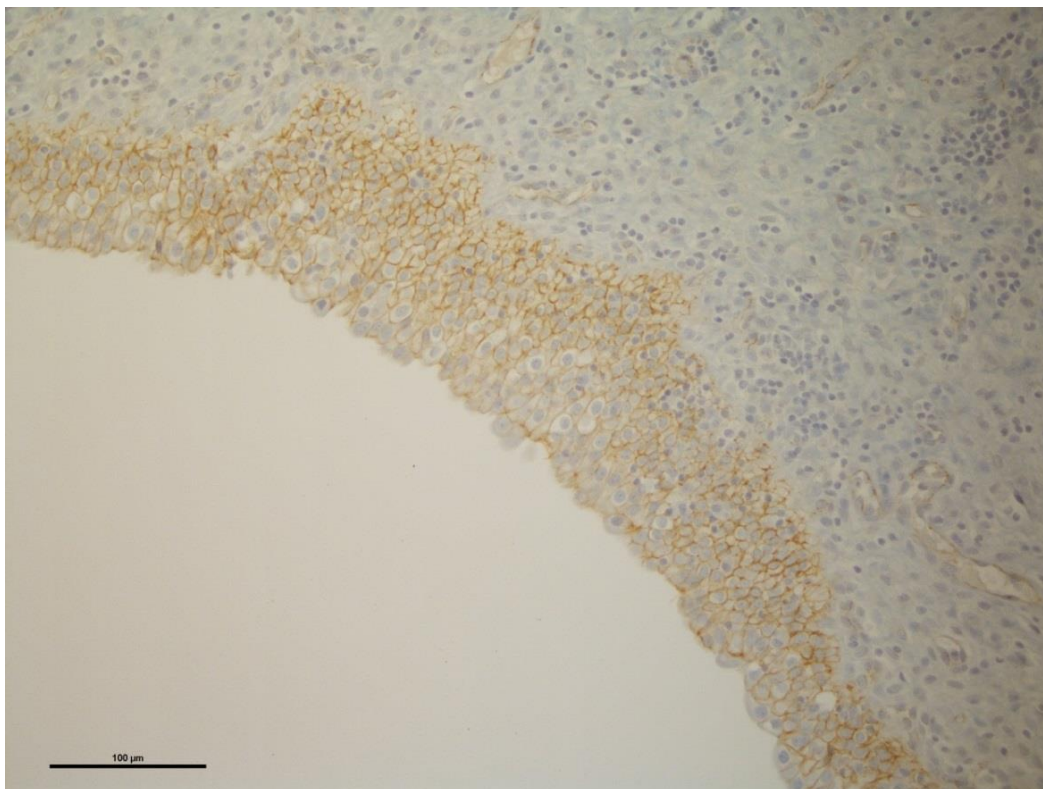


Abbildung 34: β -Catenin-Expression in normalem Urothel, hier typischerweise leicht membranär

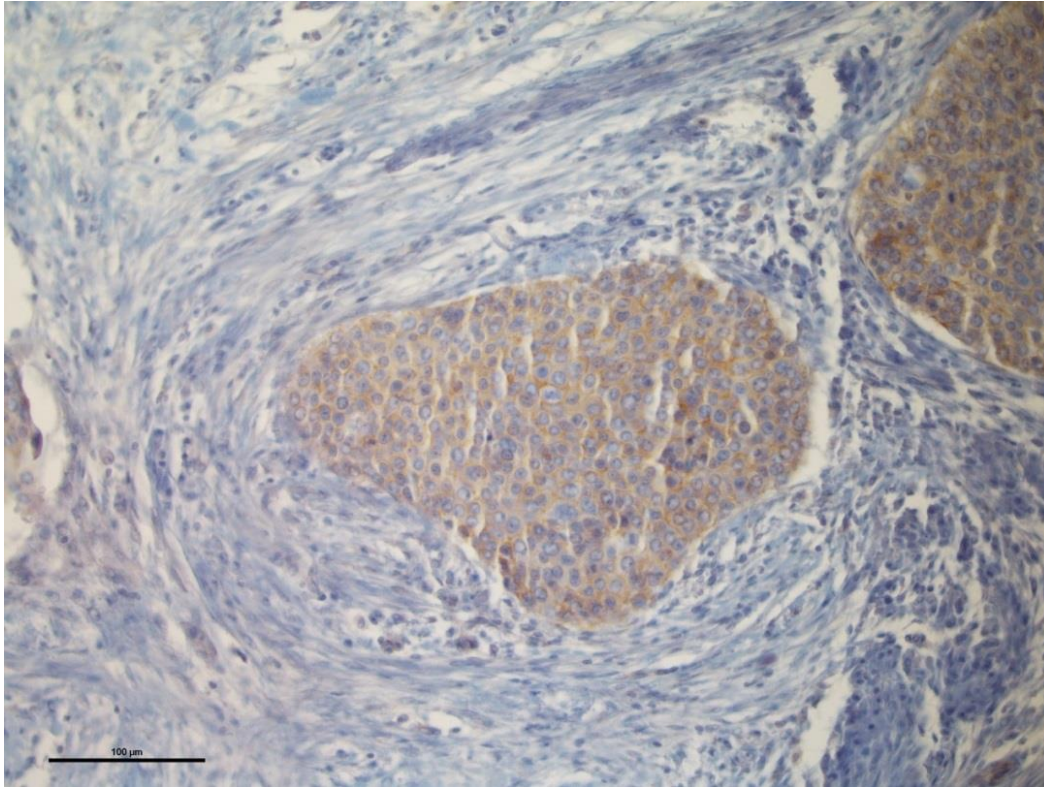


Abbildung 35: β -Catenin-Expression in Tumorgewebe, hier teilweise leicht membranär

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die β -Catenin-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe:

β-Catenin	<u>normales Urothel</u>	<u>Tumorgewebe</u>
nukleär	0%	0%
zytoplasmatisch	14%	1%
membranär	98%	77%
• stark	0%	0%
• mäßig	16%	2%
• schwach	82%	75%

Tabelle 11: Gegenüberstellung der β -Catenin-Expression in normalem versus erkranktem Gewebe

Die vorhandenen 130 Präparate mit normalem Urothel zeigten in 98% der Fälle eine positive membranäre β -Catenin-Expression, diese war überwiegend schwach ausgeprägt (0% stark, 16% mäßig, 82% schwach). In 14% der Präparate zeigte sich die Anfärbbarkeit leicht zytoplasmatisch, aber in keinem nukleär.

Bei den Tumorpräparaten wiesen lediglich 1% zytoplasmatische Färbung auf. 77% der Tumorpräparate waren membranär gefärbt - davon 0% stark, 2% mäßig und 75% schwach.

Der Vergleich der β -Catenin-Expression in Normalurothel versus Tumorgewebe zeigt also einen Verlust der zytoplasmatischen Expression um 13% sowie einen Verlust der membranären Expression um 21% auf, gleichzeitig sinkt die Stärke der membranären Expression. Dies könnte zusammen mit der verminderten E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe als Ausdruck eines Stabilitätsverlustes der interzellulären Haftkontakte im Rahmen der EMT verstanden werden.

Nachfolgende Tabelle 12 zeigt die Verteilung des Markers in normalem Urothel:

β-Catenin Verteilung	
oberflächlich	3%
verteilt	73%
basal	24%

Tabelle 12: dominierendes Färbeverhalten von β -Catenin in normalem Urothel

Es lagen wenige Präparate mit betonter Anfärbung der superfizialen Schicht vor (3%), 24% der Präparate zeigten basal betonte Färbung des Urothels, in den meisten Fällen fand sich allerdings auch bei diesem Marker eine eher gleichmäßige Färbung über alle Schichten hinweg und eine Färbedominanz war nicht erkennbar (73%).

3.4.2 Auswirkung der β -Catenin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)

Abbildung 36 veranschaulicht die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich oberflächlicher, verteilter und basaler β -Catenin-Expression in normalem Urothel:

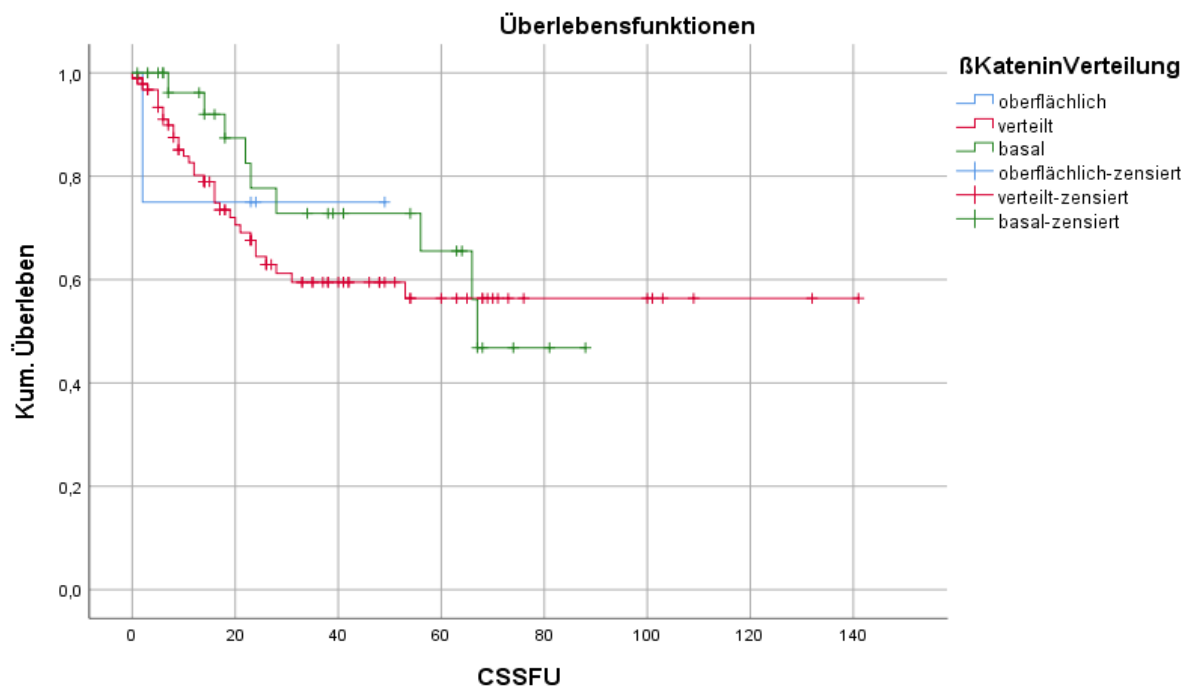


Abbildung 36: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche β -Catenin-Verteilung in normalem Urothel

Nach ca. 50 Monaten sind ca. 75% der Patienten mit oberflächlicher β -Catenin-Verteilung, ca. 73 % mit basaler und ca. 60% mit verteilter urothelialer Färbung am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Die Überlebenskurve für basale Verteilung kreuzt im Verlauf die beiden anderen. Ein eindeutiger Unterschied in den Überlebenskurven ist insgesamt nicht ersichtlich. Das Signifikanzniveau zeigt sich zudem mit einem p-Wert von 0,735 eindeutig nicht signifikant - die β -Catenin-Verteilung in normalem Urothel eignet sich folglich nicht als Prognosefaktor.

Abbildung 37 spiegelt den Einfluss positiver und negativer **zytoplasmatischer** β -Catenin-Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit wieder:

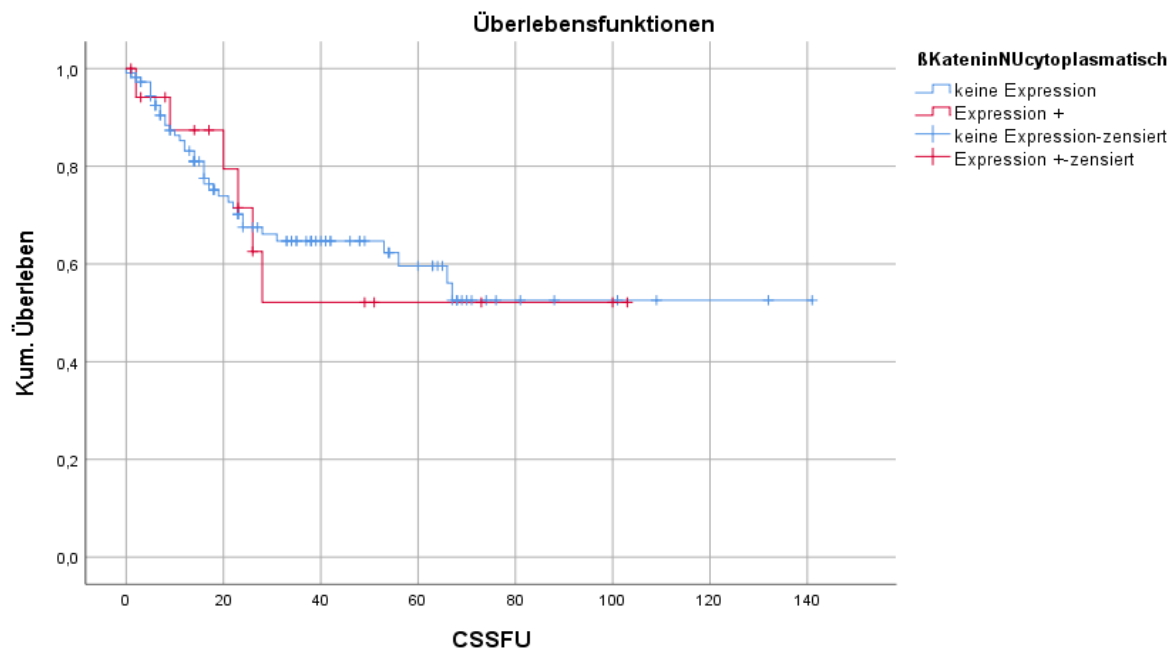


Abbildung 37: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische β -Catenin-Expression in normalem Urothel

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen hier ebenfalls keinen erkennbaren Unterschied: nach 80 Monaten sind sowohl 80% der Patienten mit negativer als auch 80% der Patienten mit positiver zytoplasmatischer β -Catenin-Expression in normalem Urothel am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,916 deutlich nicht signifikant. Die zytoplasmatische β -Catenin-Expression in normalem Urothel ist als prognostischer Marker daher unbrauchbar.

Abbildung 38 stellt den Einfluss positiver versus negativer zytoplasmatischer β -Catenin-Expression in Tumorgewebe auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

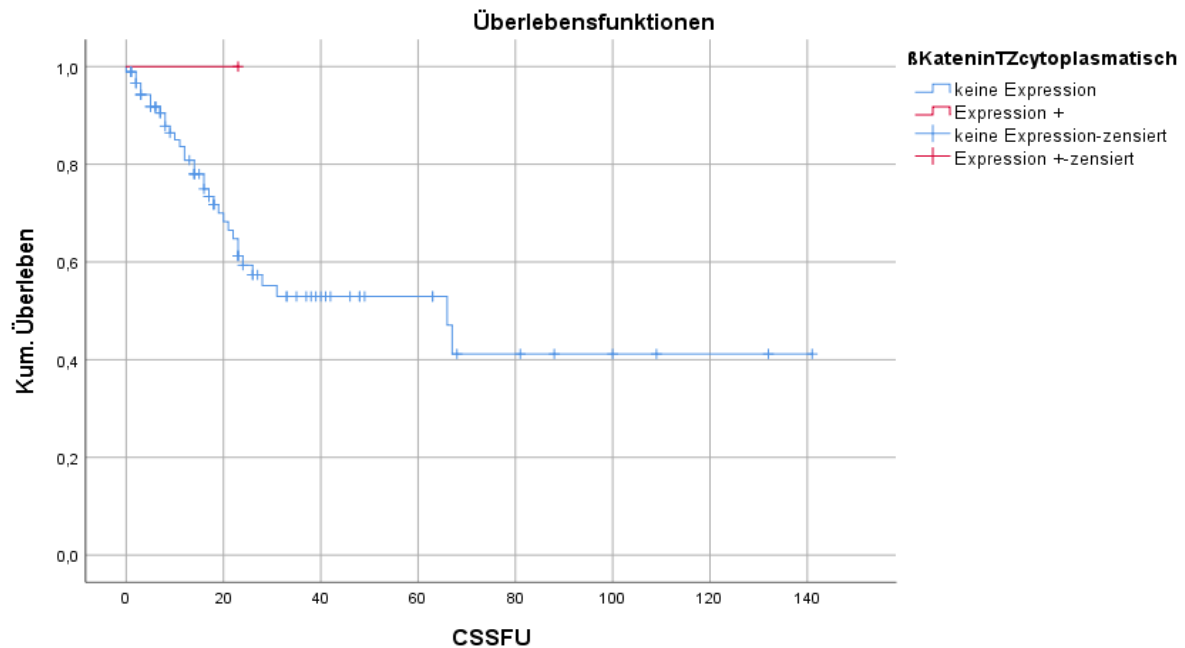


Abbildung 38: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die zytoplasmatische β -Catenin-Expression in Tumorgewebe

Ein Tumorpräparat zeigte eine positive zytoplasmatische β -Catenin-Expression, das krebsspezifische Follow Up endet bei diesem Patienten mit gut 20 Monaten. Nach 100 Monaten sind ca. 41% der Patienten mit negativer Expression am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,485, eine statistische Signifikanz ist somit nicht gegeben. Die zytoplasmatische β -Catenin-Expression in Tumorgewebe ist also als prädiktiver Marker ebenfalls ungeeignet.

Abbildung 39 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer β -Catenin-Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

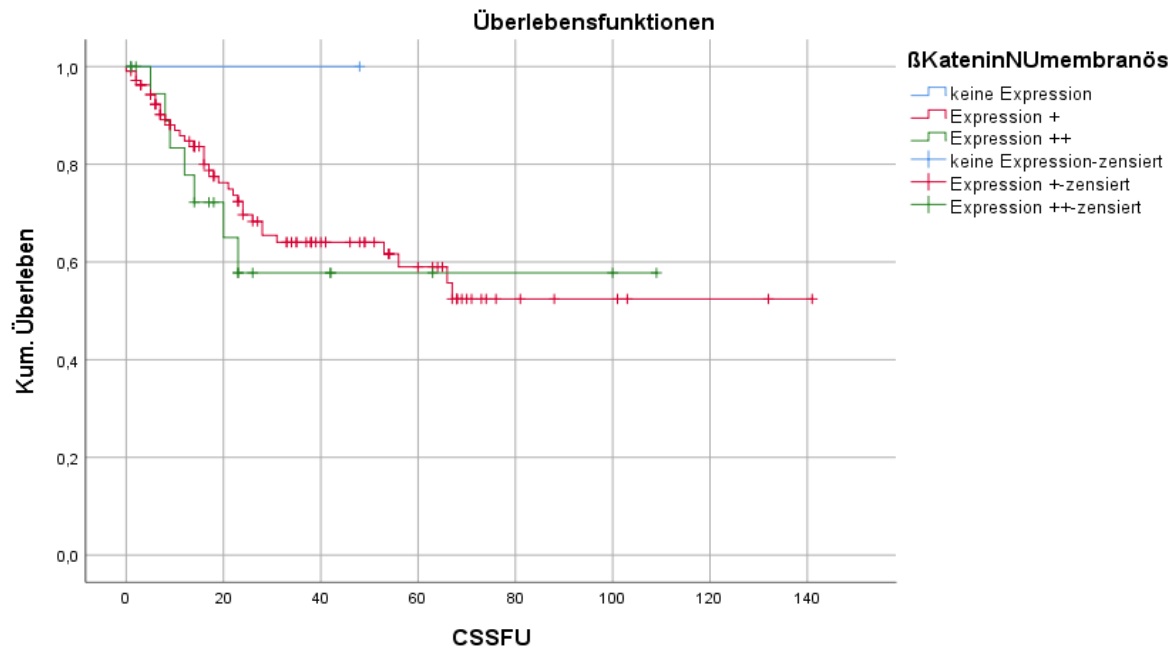


Abbildung 39: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre β -Catenin-Expression in normalem Urothel

Die beiden Überlebenskurven für Patienten mit schwacher und mäßiger β -Catenin-Expression verlaufen in etwa ähnlich: ca. 65% Patienten mit schwacher membranärer E-Cadherin-Expression in normalem Urothel sind nach 50 Monaten wahrscheinlich noch am Leben bzw. nicht am Tumor verstorben versus ca. 58% der Patienten mit mäßiger Expression. Nach ca. knapp 50 Monaten endet die krebspezifische Follow Up Zeit für den einzigen Patienten mit negativer membranärer β -Catenin-Expression. Der Log-Rank-Test erbrachte mit einem p-Wert von 0,700 keine statistische Signifikanz. Die membranäre β -Catenin-Expressionsstärke in normalem Urothel ist somit ebenfalls nicht zur Vorhersage des onkologischen Verlaufs geeignet.

Abbildung 40 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer β -Catenin-Expression in Tumorgewebe auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

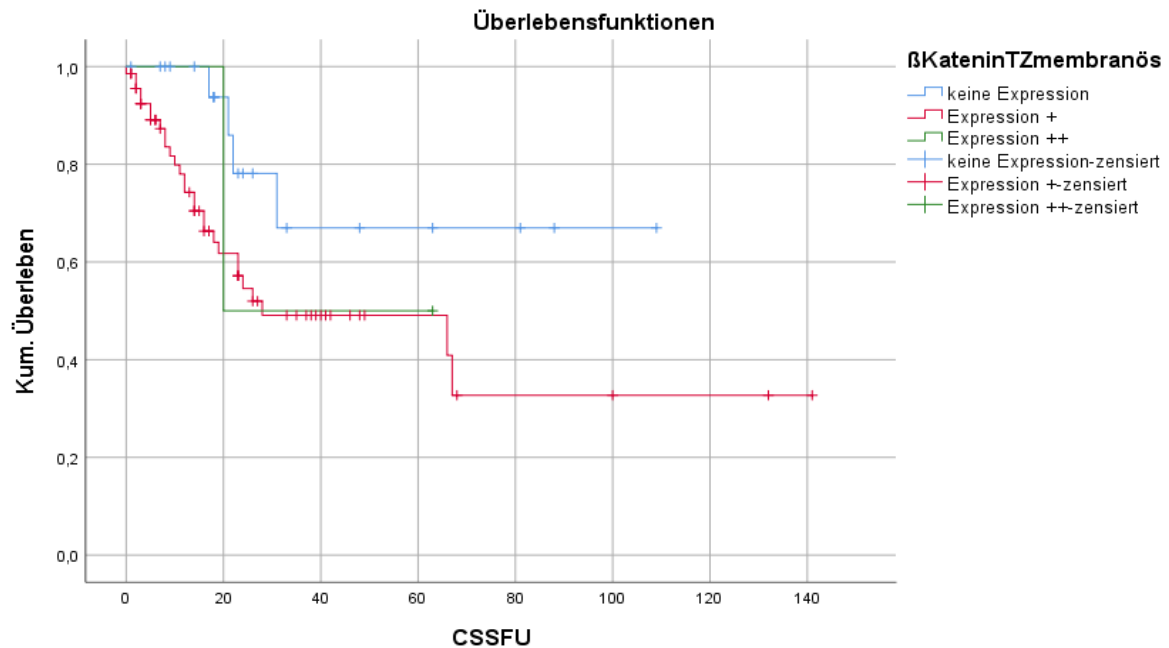


Abbildung 40: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre β -Catenin-Expression in Tumorgewebe

In Tumorgewebe zeigen die Patienten mit negativer membranärer β -Catenin-Expression nach 50 Monaten eine krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 67%, jene mit leichter und mäßiger Expression von ca. 50%. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,120, der Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit ist also statistisch nicht signifikant – die membranäre β -Catenin-Expression in Tumorgewebe ist also kein zuverlässiger Marker zur Vorhersage des onkologischen Verlaufs.

3.5 γ -Catenin

3.5.1 Deskriptive Expressionsanalyse

Im Allgemeinen wirkte die Anfärbbarkeit bei Plakoglobin (= γ -Catenin) in den Präparaten mit normalem Urothel stärker als bei β -Catenin. Neben der Expressierung im Urothel zeigte sich γ -Catenin im Zytoplasma einiger Endothelzellen pfefferkörnerartig verteilt.

Abbildung 41 zeigt, wie sich die γ -Catenin-Expression histologisch in normalem Urothel überwiegend darstellte, Abbildung 42 stellt die für Tumorgewebe typische Expression dar.

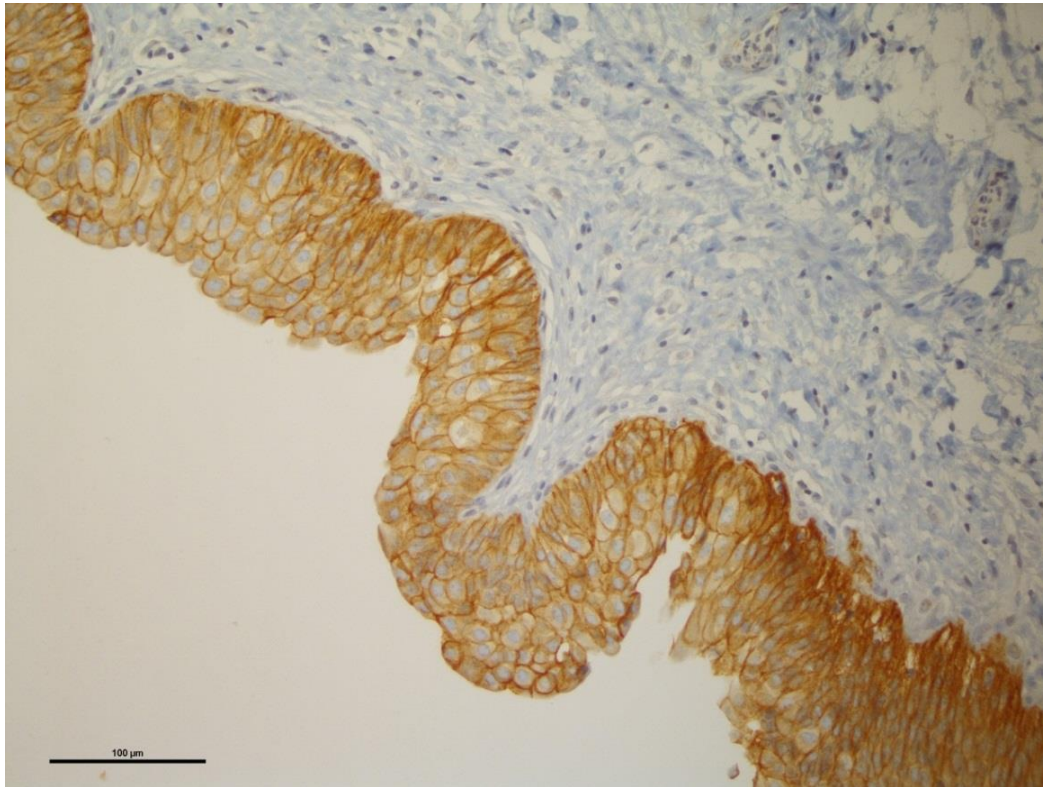


Abbildung 41: γ -Catenin-Expression in normalem Urothel, hier schwach zytoplasmatisch und mäßig membranär

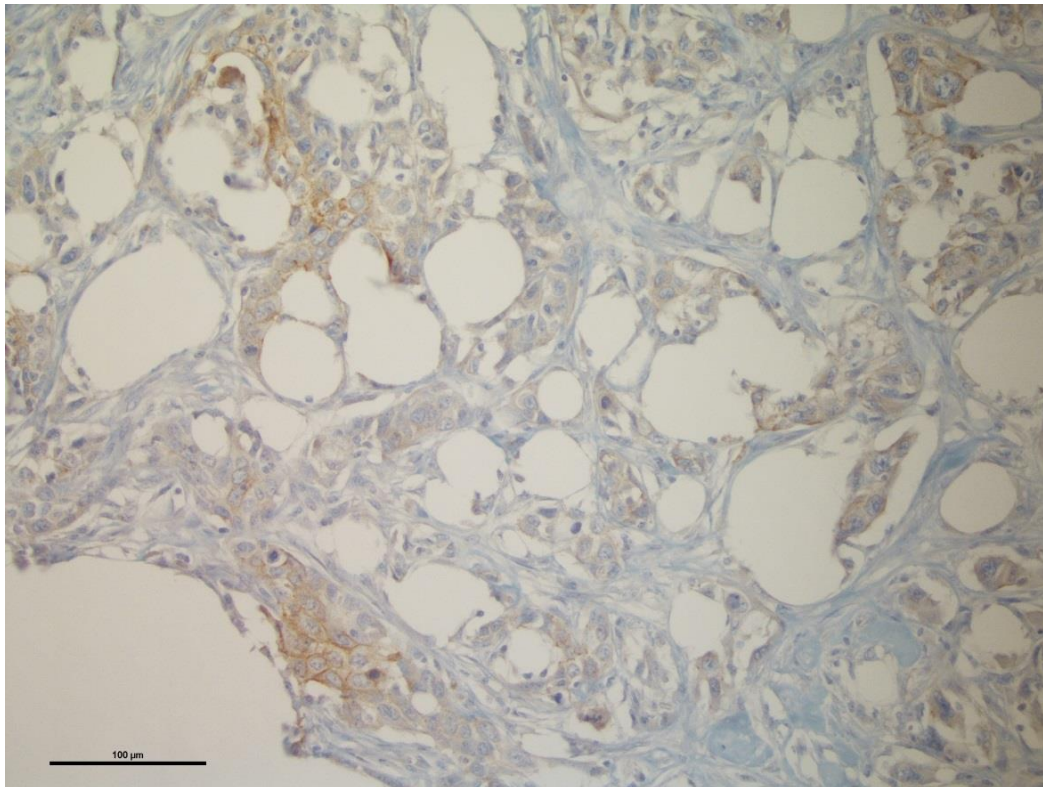


Abbildung 42: γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe. In diesem Beispiel zeigt sich die Expression nur fokal schwach membranär

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die γ -Catenin-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe:

γ-Catenin	<u>gesundes Urothel</u>	<u>Tumorgewebe</u>
nukleär	0%	1%
zytoplasmatisch	60%	49%
• stark	0%	0%
• mäßig	3%	2%
• schwach	57%	47%
membranär	92%	65%
• stark	13%	2%
• mäßig	47%	27%
• schwach	32%	36%

Tabelle 13: Gegenüberstellung der γ -Catenin-Expression in normalem versus erkranktem Gewebe

Bei γ -Catenin konnte bei der zytoplasmatischen Expression in wenigen Fällen eine etwas stärkere Färbung detektiert werden, daher nun neben der membranären auch eine Einteilung in verschiedene zytoplasmatische Expressionsstärken.

92% der Präparate mit normalem Urothel wiesen membranäre γ -Catenin-Färbung auf (13% stark, 47% mäßig, 32% schwach), 60% zeigten zytoplasmatische Expression, davon 3% mäßig und 57% schwach. Nukleär wurde γ -Catenin in normalem Urothel nie exprimiert.

In den vorliegenden 92 Tumorpräparaten waren 49% zytoplasmatisch gefärbt, davon 2% mäßig und 47% schwach. 65% der Präparate zeigten membranäre Färbung (2% stark, 27% mäßig und 36% schwach). 1% der Tumorpräparate war nukleär gefärbt (versus 0% in normalem Urothel).

Insgesamt lässt sich also auch bei γ -Catenin ein zytoplasmatischer und membranärer Expressionsverlust in Tumorgewebe feststellen, die zytoplasmatische und membranäre Expressionsstärke ist dort ebenfalls verringert. Interessanterweise zeigt sich bei 1% eine zunehmende nukleäre Expression in Tumorgewebe.

Nachfolgende Tabelle 14 zeigt die Verteilung des Markers in normalem Urothel:

γ-Catenin Verteilung	
oberflächlich	30%
verteilt	68%
basal	2%

Tabelle 14: dominierendes Färbeverhalten von γ -Catenin in gesundem Urothel

In normalem Urothel lagen Präparate mit betonter Anfärbung der superfizialen Schicht vor (30%), 2% der Präparate zeigten basal betonte Färbung des Urothels. Überwiegend fand sich auch bei γ -Catenin eine eher gleichmäßig betonte Färbung über alle Schichten und eine Färbedominanz war nicht erkennbar (68%).

3.5.2 Auswirkung der γ -Catenin-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)

Abbildung 43 veranschaulicht die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich oberflächlicher, verteilter und basaler γ -Catenin-Expression in normalem Urothel:

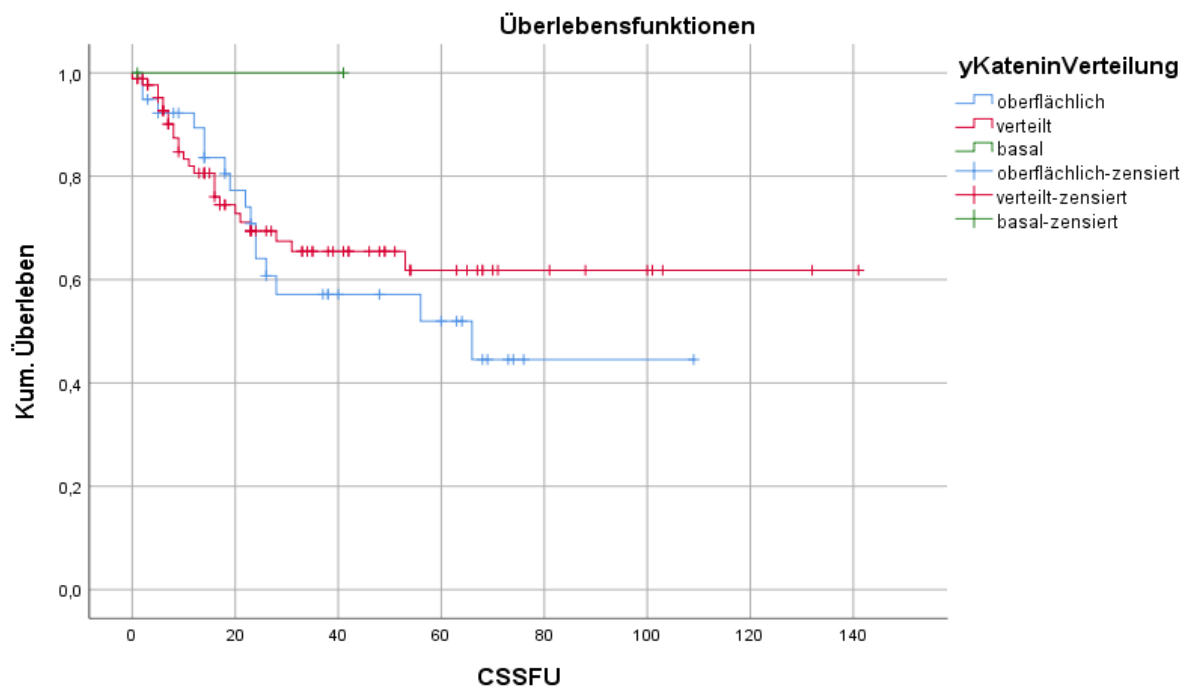


Abbildung 43: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche γ -Catenin-Verteilung in normalem Urothel

Nach 40 Monaten sind alle Patienten mit basal betonter Färbung am Leben oder nicht am Tumor verstorben, bei Patienten mit verteilter Färbung liegt die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bei ca. 66%, bei Patienten mit oberflächlicher Färbung bei ca. 58%. Somit geht (ähnlich wie bei E- und N-Cadherin) eine basal betonte Anfärbung in normalem Urothel mit besserem CCS als eine verteilte oder eine oberflächliche Expression einher - das Signifikanzniveau zeigt sich mit einem p-Wert von 0,627 allerdings nicht signifikant, ein Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit ist hinsichtlich basaler, verteilter oder superfizialer

Färbung somit statistisch unwahrscheinlich - die γ -Catenin-Verteilung in normalem Urothel ist folglich ebenfalls kein brauchbarer Prognosemarker.

Abbildung 44 spiegelt den Einfluss positiver und negativer zytoplasmatischer γ -Catenin-Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit wieder:

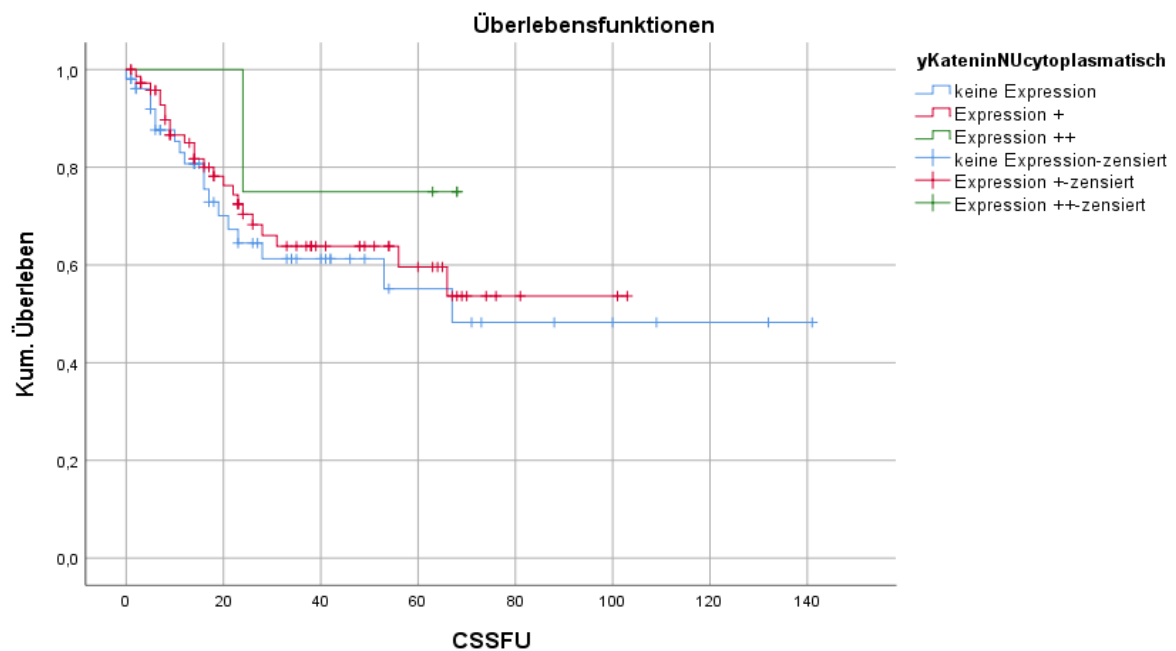


Abbildung 44: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische γ -Catenin-Expression in normalem Urothel

Nach 50 Monaten liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit mäßiger zytoplasmatischer γ -Catenin-Expression bei ca. 75%, bei Patienten mit schwacher Expression bei ca. 65% und bei Patienten mit negativer Expression bei ca. 61%. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,605 keine statistische Signifikanz für den Unterschied in den einzelnen Überlebenswahrscheinlichkeiten. Insgesamt zeigt sich somit ein statistisch nicht signifikantes, besseres CCS bei negativer zytoplasmatischer γ -Catenin-Expression in normalem Urothel. Als zuverlässiger Prognosemarker ist die zytoplasmatische γ -Catenin-Expression in normalem Urothel jedoch nicht zu sehen.

Abbildung 45 stellt den Einfluss positiver versus negativer zytoplasmatischer γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

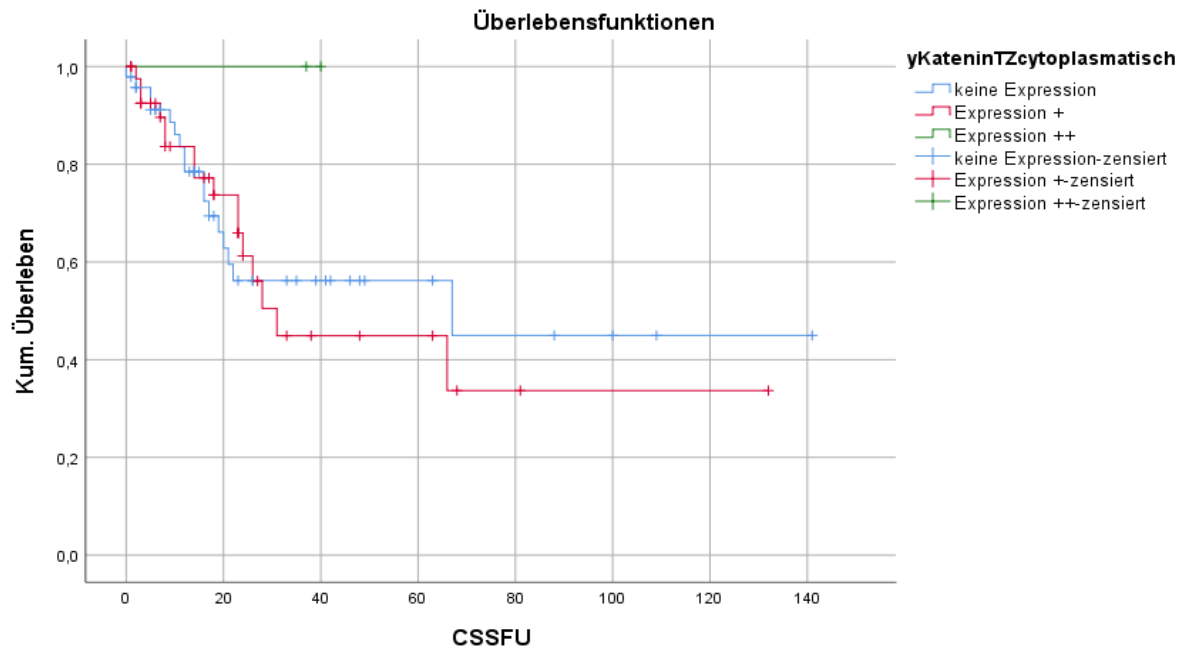


Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe

Nach 40 Monaten sind alle Patienten mit mäßiger Expression am Leben bzw. nicht am Tumor verstorben, danach endet das krebsspezifische Follow Up für diese Gruppe. Zu diesem Zeitpunkt liegt die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit negativer γ -Catenin-Expression bei ca. 57% und bei Patienten mit schwacher Expression bei ca. 45%. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,503. Somit ist das Ergebnis statistisch nicht signifikant, als unabhängiger Prognosemarker ist die zytoplasmatische γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe somit ebenfalls nicht geeignet.

Abbildung 46 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer γ -Catenin-Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

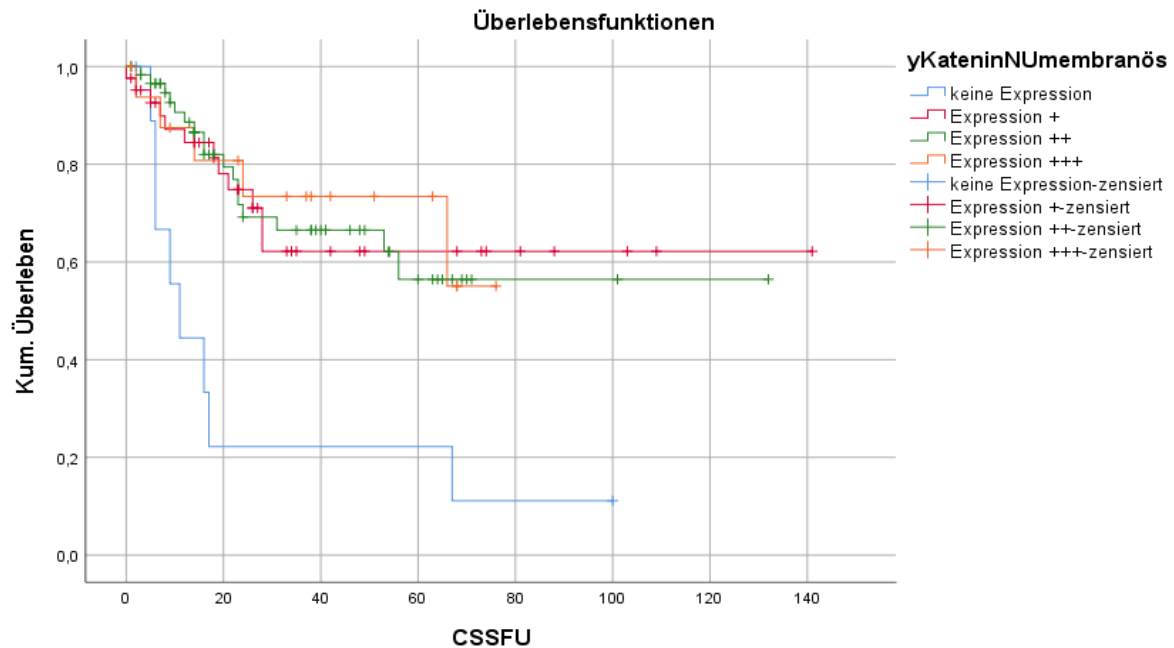


Abbildung 46: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke γ -Catenin-Expression in normalem Urothel

Nach 40 Monaten sind ca. 73% der Patienten mit starker versus ca. 67% mit mäßiger und ca. 62% mit schwacher membranärer γ -Catenin-Expression in normalem Urothel am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben, Patienten mit negativer Expression haben mit 22% krebspezifischer Überlebenswahrscheinlichkeit die schlechteste Prognose. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,001 eindeutig statistische Signifikanz - somit stellt die membranäre γ -Catenin-Expression in normalem Urothel möglicherweise einen brauchbaren prognostischen Marker dar.

Abbildung 47 veranschaulicht den Einfluss unterschiedlich starker membranärer γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit:

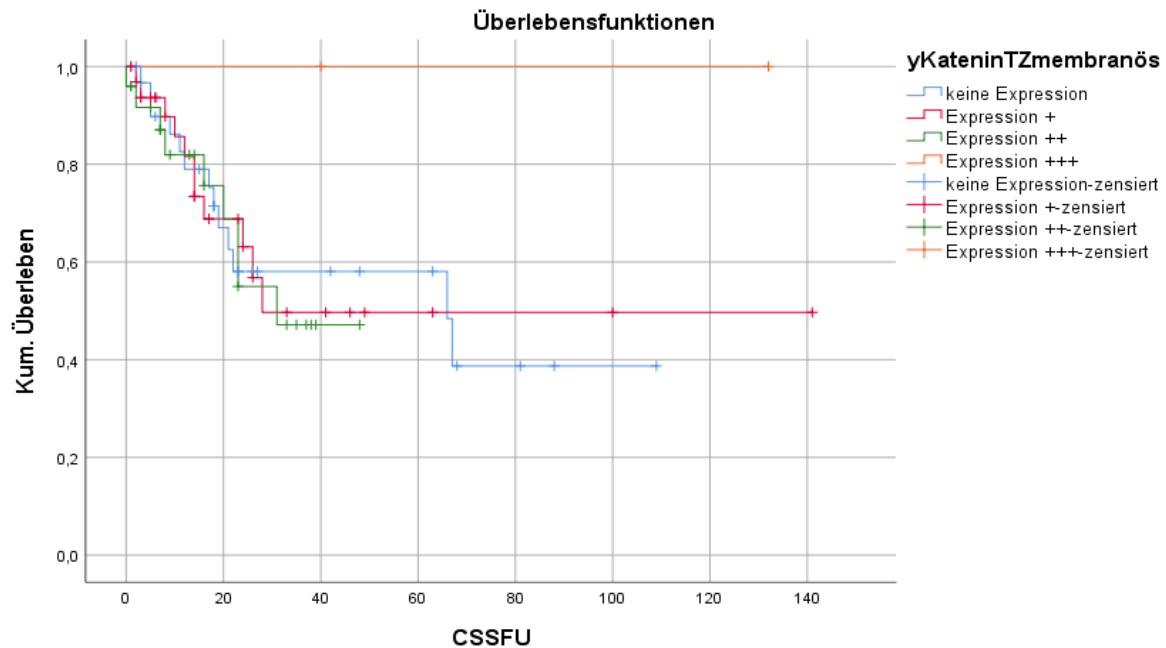


Abbildung 47: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe

Nach 50 Monaten sind alle Patienten mit starker membranärer γ -Catenin-Expression am Leben oder nicht am Tumor verstorben versus ca. 59% der Patienten mit negativer, ca. 50% mit schwacher und ca. 48% mit mäßiger Expression. Der Log-Rank-Test erbringt einen p-Wert von 0,639. Insgesamt zeigt sich also zwar ein besseres krebspezifisches Überleben bei starker membranärer γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe, allerdings besteht keine statistische Signifikanz.

3.6 TIMP1

3.6.1 Deskriptive Expressionsanalyse

In gesundem Gewebe zeigten sich grundsätzlich über das gesamte Präparat hinweg pfefferkörnerartig verteilt viele einzelne Zellen mit extrem kräftiger zytoplasmatischer Expression von TIMP1, vor allem in Bindegewebe und Perimysium sowie in Endothelzellen. Auch in Tumorgewebe waren solche Zellen vorhanden, aber niedriger frequentiert.

Die TIMP1-Färbung verhielt sich wie exemplarisch in Abbildung 48 (normales Urothel) und Abbildung 49 (Urothelkarzinom) dargestellt:

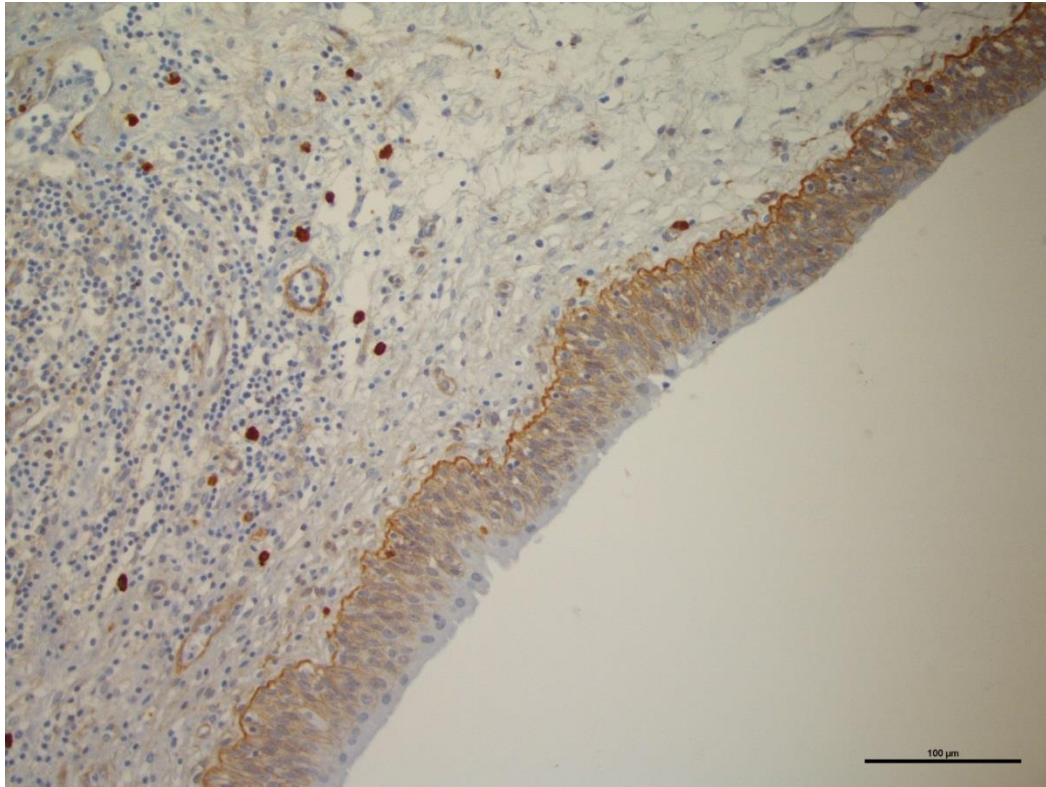


Abbildung 48: TIMP1-Expression in normalem Urothel, hier schwach membranär und typischerweise mit betonter Färbung der Basalmembran

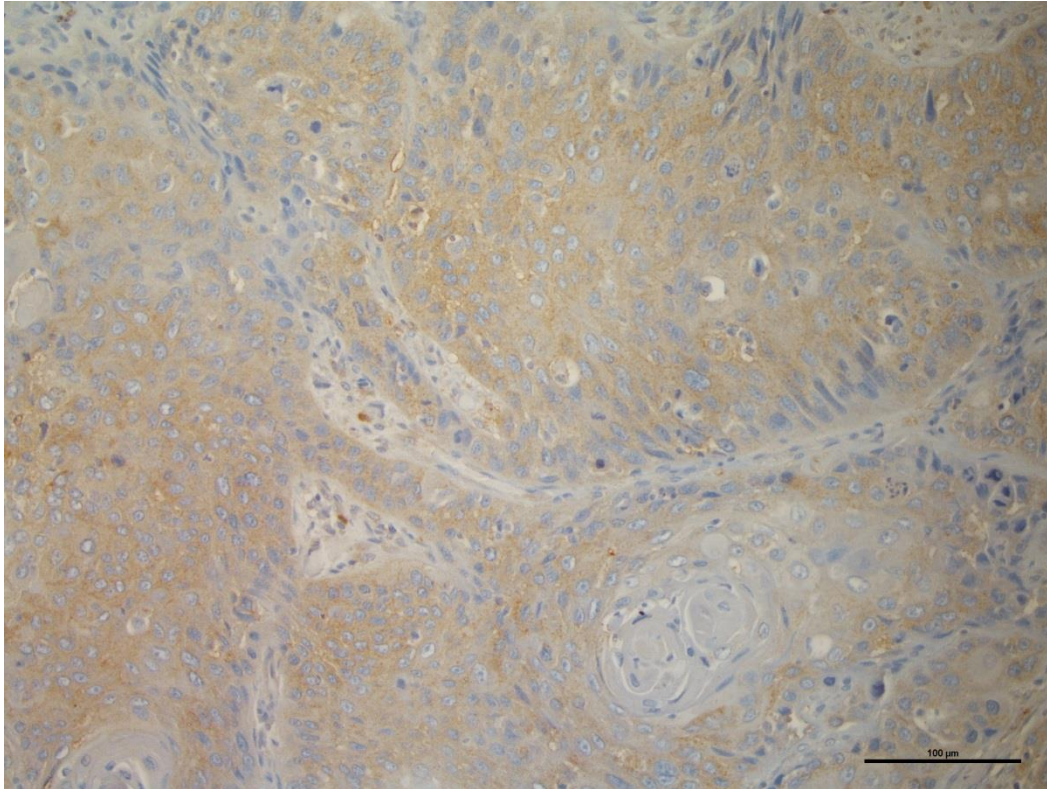


Abbildung 49: TIMP1-Expression in Tumorgewebe, hier hauptsächlich schwach zytoplasmatisch

Tabelle 15 gibt einen Überblick über die TIMP1-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe:

TIMP1	<u>normales Urothel</u>	<u>Tumorgewebe</u>
nukleär	0%	0%
zytoplasmatisch	17%	66%
membranär	99%	53%
• stark	0%	0%
• mäßig	2%	0%
• schwach	97%	53%

Tabelle 15: Gegenüberstellung der TIMP1-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe

In normalem Urothel wiesen 99% der Präparate membranäre Färbung auf, die sich hauptsächlich als schwach darstellte (0% stark, 2% mäßig, 97% schwach). 17% der Präparate zeigten zytoplasmatische Färbung, nukleär wurde TIMP1 nie exprimiert.

66% der Tumorpräparate wiesen zytoplasmatische Färbung auf, 53% waren membranär gefärbt (ausschließlich schwach).

Bei einem Vergleich der Markerexpression von normalem gegenüber erkranktem Gewebe zeigt sich ein membranärer TIMP1-Expressionsverlust um 46% in Tumorgewebe. Auffällig ist ein gleichzeitiger Expressionsanstieg um 49% im Zytoplasma der Tumorzellen.

Nachfolgende Tabelle 16 zeigt die Verteilung des Markers in normalem Urothel:

TIMP1 Verteilung	
oberflächlich	2%
verteilt	7%
basal	92%

Tabelle 16: dominierendes Färbeverhalten von TIMP1 in normalem Urothel

Auffällig war eine schwach bis mäßige Färbung der Basalmembran in nahezu jedem Präparat; oftmals war die Basalmembran die einzig gefärbte Struktur im Urothel. Dies ist ursächlich für die hohe Anzahl an basal betont bewerteter Färbungen (92%). Superfizial betonte Expression lag in 2% der Präparate vor, bei 7% war eine basale oder superfiziale Färbedominanz nicht erkennbar.

3.6.2 Auswirkung der TIMP1-Expression auf das krebsspezifische Überleben (CCS)

Abbildung 50 veranschaulicht die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich oberflächlicher, verteilter und basaler TIMP1-Expression in normalem Urothel:

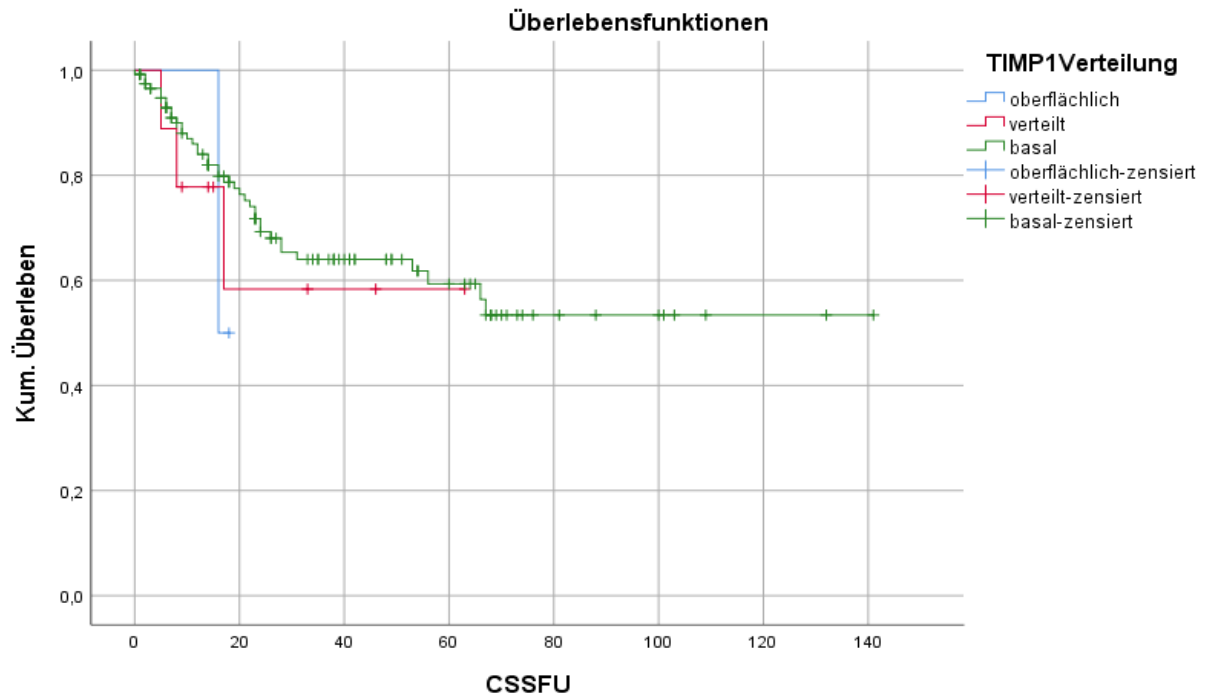


Abbildung 50: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche TIMP1-Verteilung in normalem Urothel

Ein deutlicher Unterschied in der Überlebensverteilung der Patienten mit basaler, oberflächlicher und verteilter Färbung ist in der Abbildung nicht erkennbar. Nach ca. 50 Monaten sind ca. 64% der Patienten mit basal betonter Färbung am Leben oder nicht am Tumor verstorben versus ca. 59% der Patienten mit verteilter Färbung. Das krebsspezifische Follow Up der Patienten mit superfizialer Färbung endet bereits nach knapp 20 Monaten, die längste Follow Up Zeit mit 140 Monaten liegt bei Patienten mit basal betonter Färbung; insgesamt zeigt sich also allenfalls ein minimal besseres CSS bei Patienten mit basal betonter Färbung. Der Log-Rank Test ergab mit einem p-Wert von 0,696 keine statistische Signifikanz. Die TIMP1-Verteilung in normalem Urothel eignet sich also insgesamt nicht zur Vorhersage des onkologischen Verlaufes.

Abbildung 51 spiegelt den Einfluss positiver oder negativer zytoplasmatischer Expression in normalem Urothel auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit wieder:

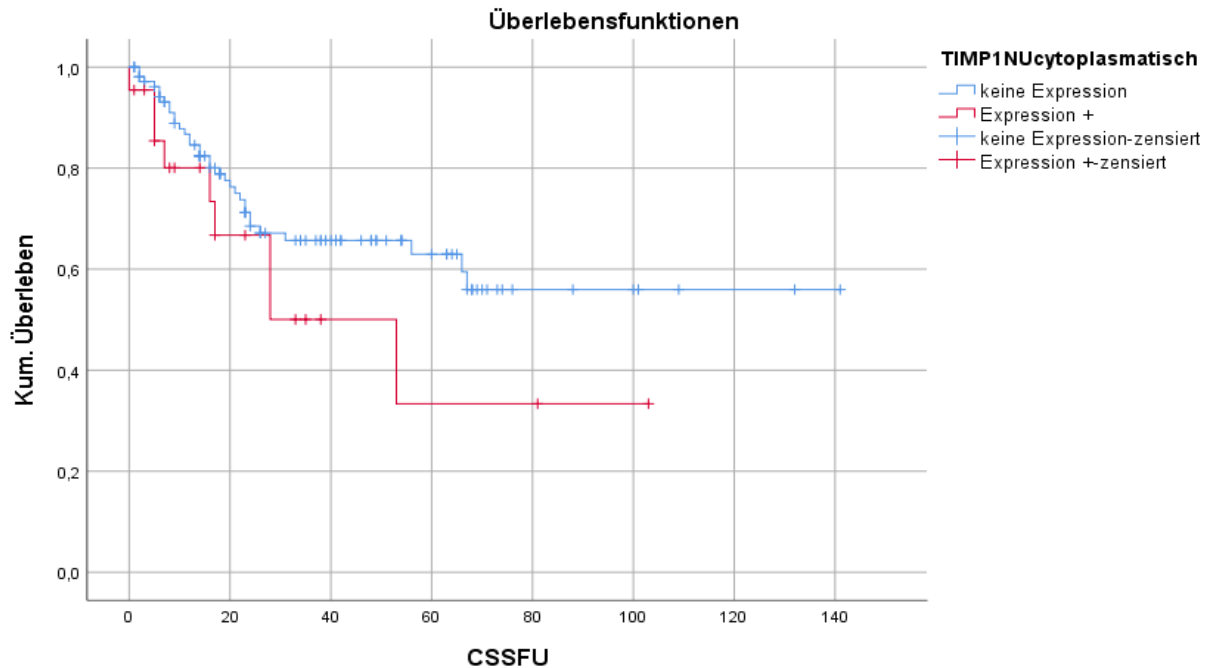


Abbildung 51: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische TIMP1-Expression in normalem Urothel

Mit ca. 100 Monaten sind ca. 56% der Patienten mit negativer TIMP1-Expression in normalem Urothel versus ca. 33% der Patienten mit positiver Expression am Leben. Der Log-Rank-Test zeigte sich allerdings mit einem p-Wert von 0,152 nicht signifikant für den Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Insgesamt zeigen somit Patienten mit negativer zytoplasmatischer TIMP1-Expression in normalem Urothel eine bessere, jedoch statistisch im Unterschied nicht signifikante Überlebenswahrscheinlichkeit - als prognostischer Marker ist die zytoplasmatische TIMP1-Expression in normalem Urothel somit ebenfalls ungeeignet.

Abbildung 52 stellt den Einfluss positiver versus negativer zytoplasmatischer TIMP1-Expression in Tumorgewebe auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

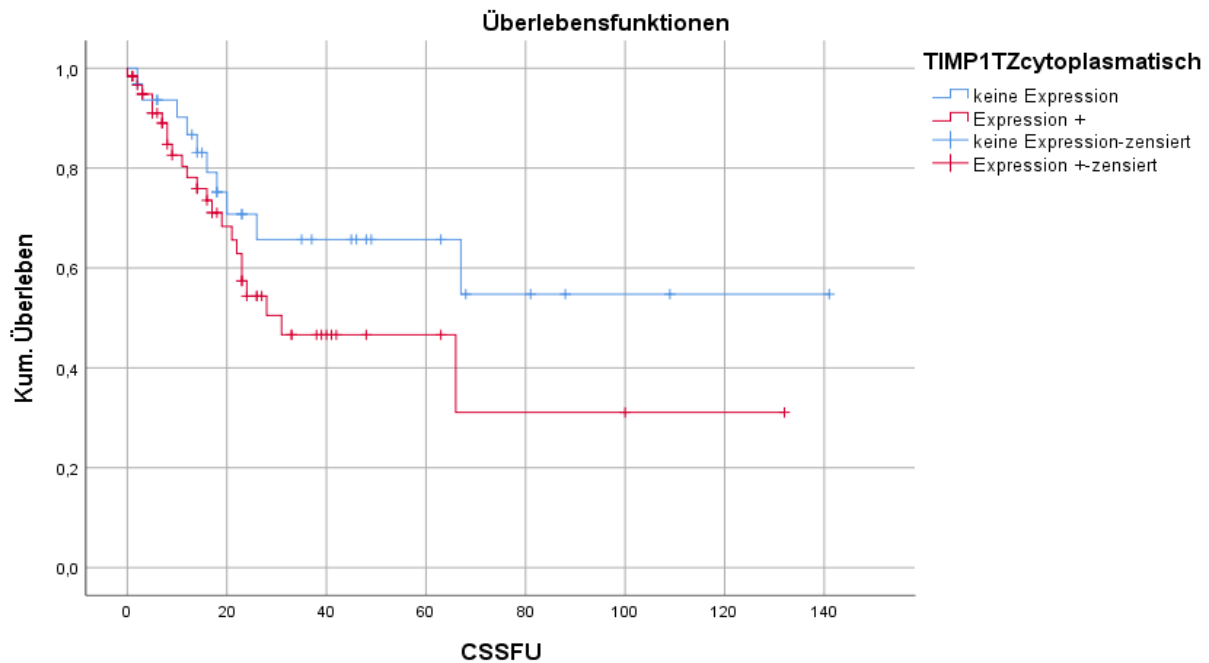


Abbildung 52: Unterschiedliche krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die zytoplasmatische TIMP1-Expression in Tumorgewebe

Bei ca. 100 Monaten krebspezifischem Follow Up sind ca. 55% der Patienten mit negativer zytoplasmatischer TIMP1-Expression in Tumorgewebe versus ca. 31% der Patienten mit positiver TIMP1-Expression am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,164 keine statistische Signifikanz.

Wie in normalem Urothel zeigen somit auch Patienten mit negativer zytoplasmatischer TIMP1 Expression in Tumorgewebe eine bessere (um ca. 24%), jedoch statistisch im Unterschied nicht signifikante Überlebenswahrscheinlichkeit. Zur sicheren Vorhersage des onkologischen Verlaufs ist daher auch die zytoplasmatische TIMP1-Expression in Tumorgewebe nicht geeignet.

Abbildung 53 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer TIMP1-Expression in normalem Urothel auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

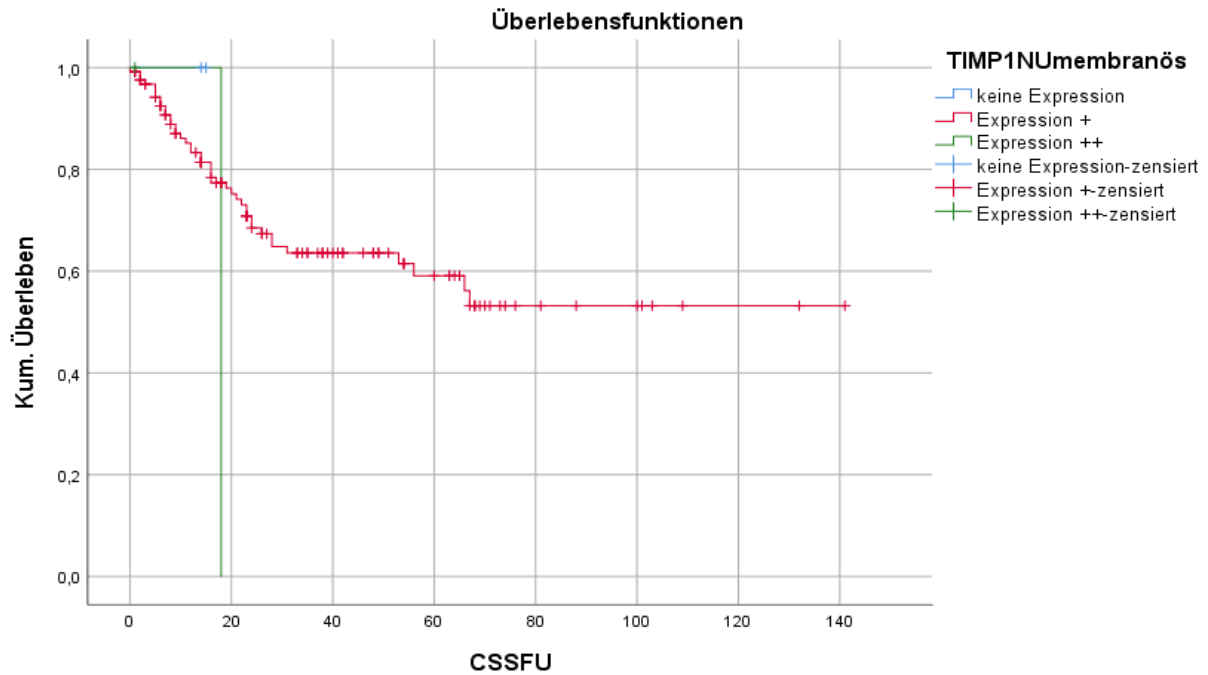


Abbildung 53: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die Stärke der membranären TIMP1-Expression in normalem Urothel

Nach 100 Monaten sind ca. 53% der Patienten mit schwacher membranärer Expression in normalem Urothel noch am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Die krebspezifische Überlebenskurve der Patienten mit negativer und mäßiger Expression endet bereits mit knapp 20 Monaten. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,298 keine statistische Signifikanz für den Unterschied in den Überlebenswahrscheinlichkeiten. Die membranäre TIMP1-Expressionsstärke in normalem Urothel kommt daher zur Vorhersage des onkologischen Verlaufs nicht in Betracht.

Abbildung 54 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer TIMP1-Expression in Tumorgewebe auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

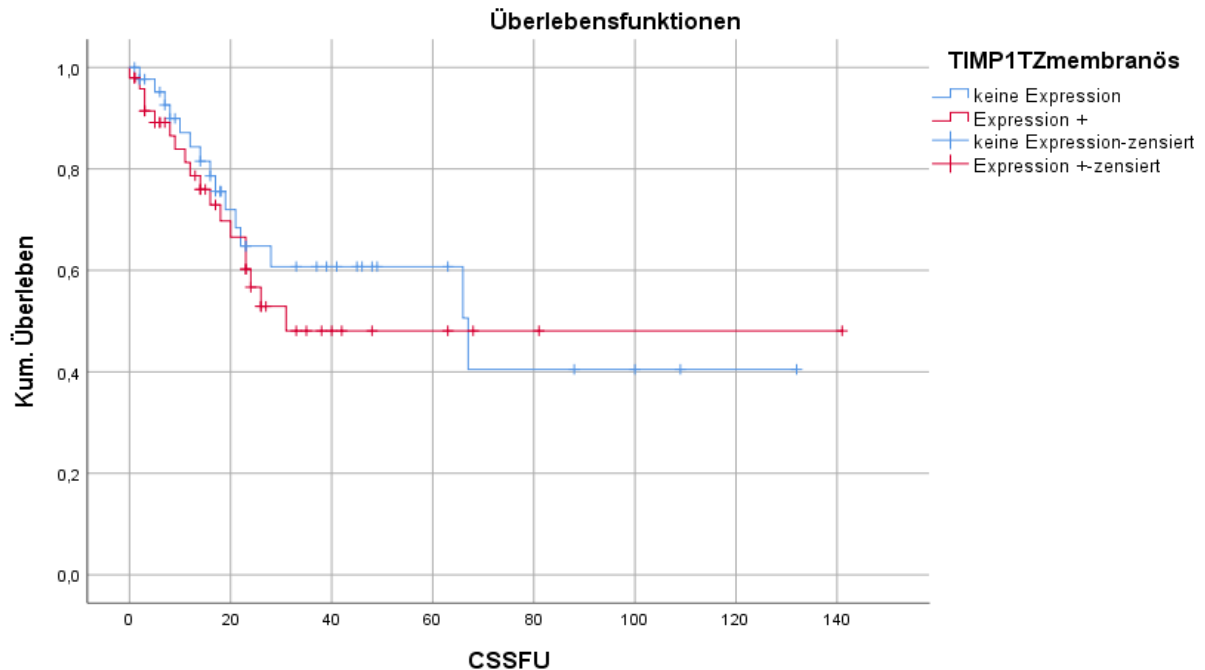


Abbildung 54: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf unterschiedlich starke membranäre TIMP1-Expression in Tumorgewebe

In Tumorgewebe zeigen nach 50 Monaten Follow Up die Patienten mit negativer TIMP1-Expression eine tumorspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 61% und jene mit positiver schwacher Expression von ca. 48%. Nach ca. 65 Monaten kreuzt die Überlebenskurve der Patienten mit negativer Expression: danach sind noch ca. 40% der Patienten am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,521 keine statistische Signifikanz – auch die membranäre TIMP1-Expressionsstärke in Tumorgewebe ist daher als Prognosemarker ungeeignet.

3.7 FGFR3

3.7.1 Deskriptive Expressionsanalyse

FGFR3 fand sich in normalem Gewebe neben der Expression in Urothelzellen auch manchmal in Muskel- sowie in Entzündungszellen. Hier zeigte sich die Färbung in Form eines meist stark gefärbten perinukleären Hofes. Solche Entzündungszellen fanden sich vor allem in der Lamina propria. Im Urothel selbst stellte sich eine

FGFR3-Expression mit pfefferkörnertartigem Verteilungsmuster dar, der prozentuale Anteil der Färbung ließ sich deswegen oftmals schwer einschätzen.

Nachfolgende Abbildungen 55-58 sollen veranschaulichen, wie sich die FGFR3-Färbungen in normalem und erkranktem Gewebe mikroskopisch präsentierten:

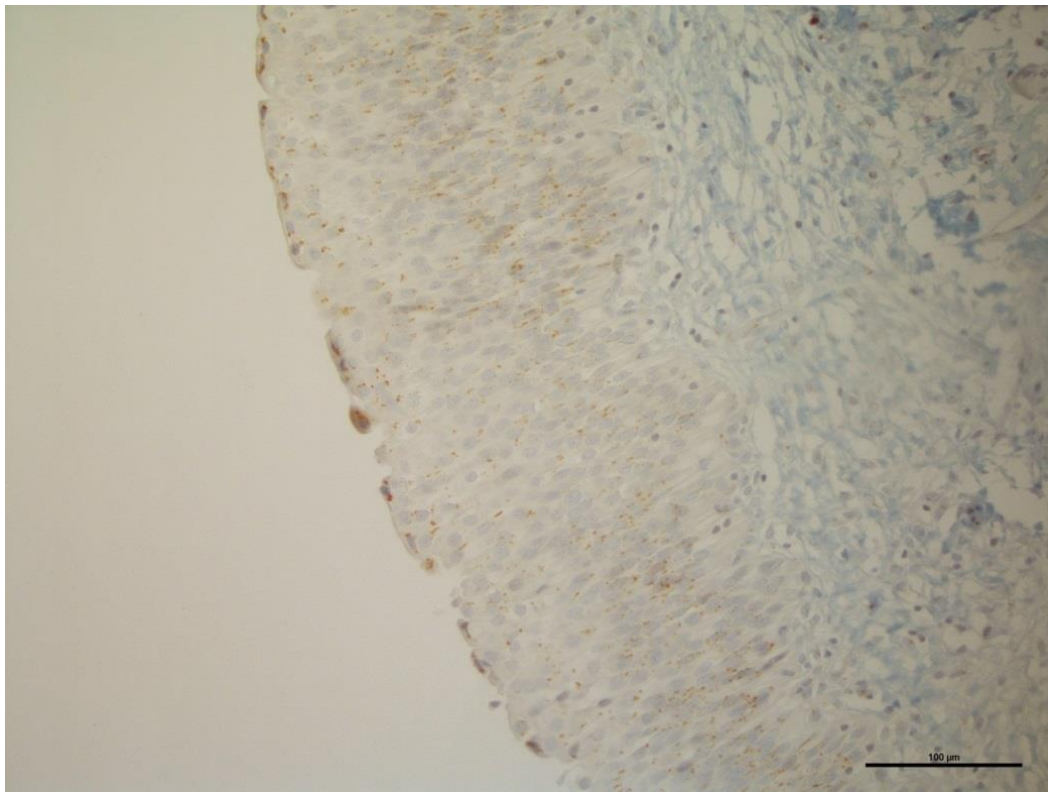


Abbildung 55: zytoplasmatische FGFR3-Expression in normalem Urothel, hier typischerweise schwach pfefferkörnertartig verteilt

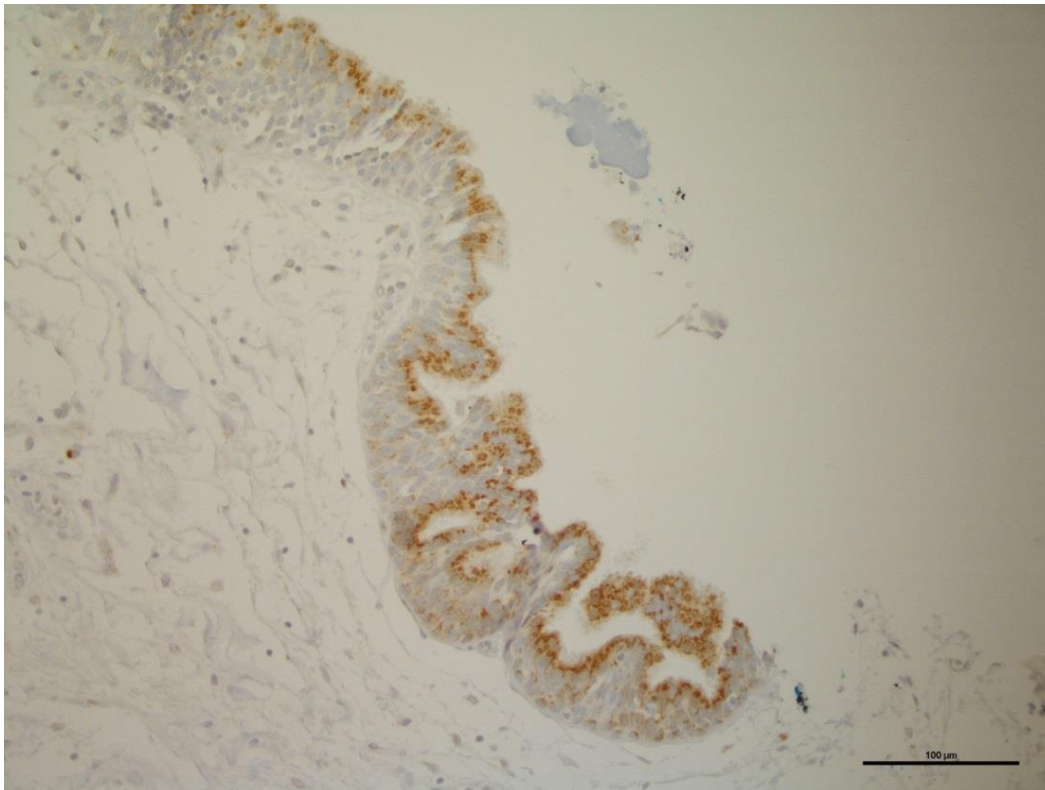


Abbildung 56: Superficial betonte FGFR3-Expression in normalem Urothel

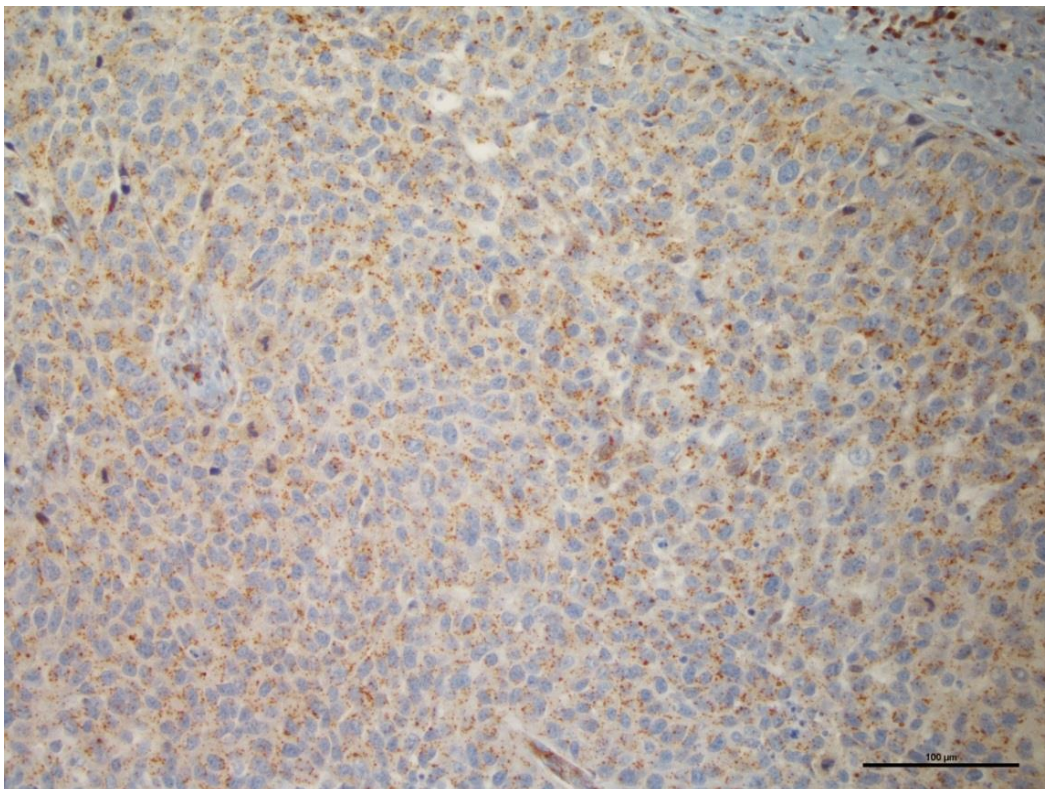


Abbildung 57: FGFR3-Expression in Tumorgewebe, mäßig zytoplasmatisch

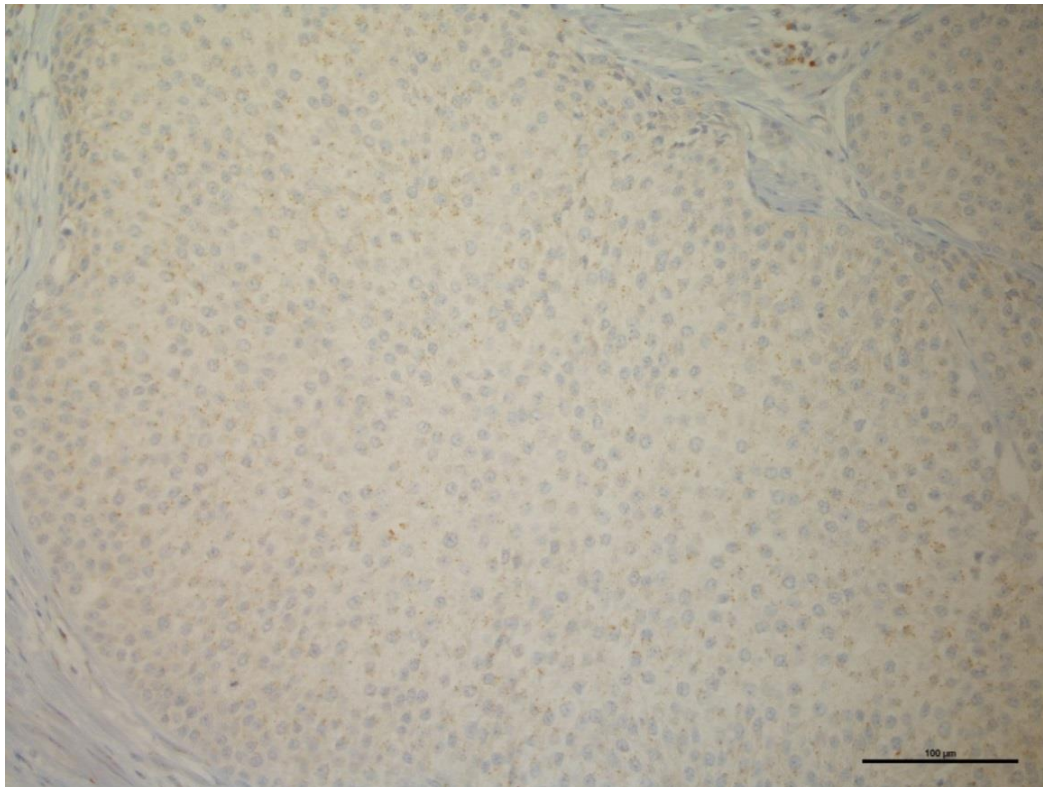


Abbildung 58: FGFR3-Expression in Tumorgewebe, schwach zytoplasmatisch

Tabelle 17 gibt einen Überblick über die FGFR3-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe:

FGFR3	<u>normales Urothel</u>	<u>Tumorgewebe</u>
nukleär	0%	0%
zytoplasmatisch	86%	97%
• stark	1%	3%
• mäßig	14%	25%
• schwach	72%	69%
membranär	1%	1%
• stark	0%	0%
• mäßig	1%	0%
• schwach	0%	1%

Tabelle 17: Gegenüberstellung der FGFR3-Expression in normalem versus erkranktem Gewebe

Die Urothelzellen in normalem Gewebe zeigten hauptsächlich zytoplasmatische FGFR3-Expression (86%), die membranäre Expression lag bei 1% (mäßig), nukleär wurde FGFR3 nie exprimiert. Die zytoplasmatische Färbung war dabei überwiegend schwach (1% stark, 14% mäßig, 72% schwach). Als „mäßig gefärbt“ wurden dabei solche Zellen bewertet, deren Markerexpression bereits deutlich bei 100-facher Vergrößerung erkennbar war. War die Anfärbung erst bei 400-facher Vergrößerung sichtbar, wurde die zytoplasmatische Expression als „schwach“ gewertet.

In den 92 Tumorpräparaten wiesen 97% der Tumorpräparate zytoplasmatische Färbung auf (3% stark, 25% mäßig, 69% schwach), die membranäre Expression lag bei lediglich 1% (schwach), nukleär wurde FGFR3, genau wie in normalem Urothel, nie exprimiert.

Beim Vergleich der FGFR3-Expression in Tumor- versus Normalgewebe zeigt sich also insgesamt ein zytoplasmatischer Expressionsanstieg von 11% in Tumorgewebe, auch die zytoplasmatische Expressionstärke ist zunehmend. Die membranäre FGFR3-Expression zeigt einen Verlust der Expressionstärke von 1% mäßiger nach 1% schwacher Anfärbung.

Nachfolgende Tabelle 18 zeigt die Verteilung des Markers in normalem Urothel:

FGFR3 Verteilung	
oberflächlich	14%
verteilt	82%
basal	4%

Tabelle 18: dominierendes Färbeverhalten von FGFR3 in normalem Urothel

14% der Präparate in normalem Urothel wiesen superfizial betonte Expression auf, 4% der Präparate zeigten basal betonte Färbung des Urothels. Überwiegend fand sich bei FGFR3 eine eher gleichmäßig betonte Färbung über alle Schichten und eine Färbedominanz war nicht erkennbar (82%).

3.7.2 Auswirkung der FGFR3-Expression auf das krebspezifische Überleben (CCS)

Abbildung 59 veranschaulicht die unterschiedliche krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich oberflächlicher, verteilter und basaler FGFR3-Expression in normalem Urothel:

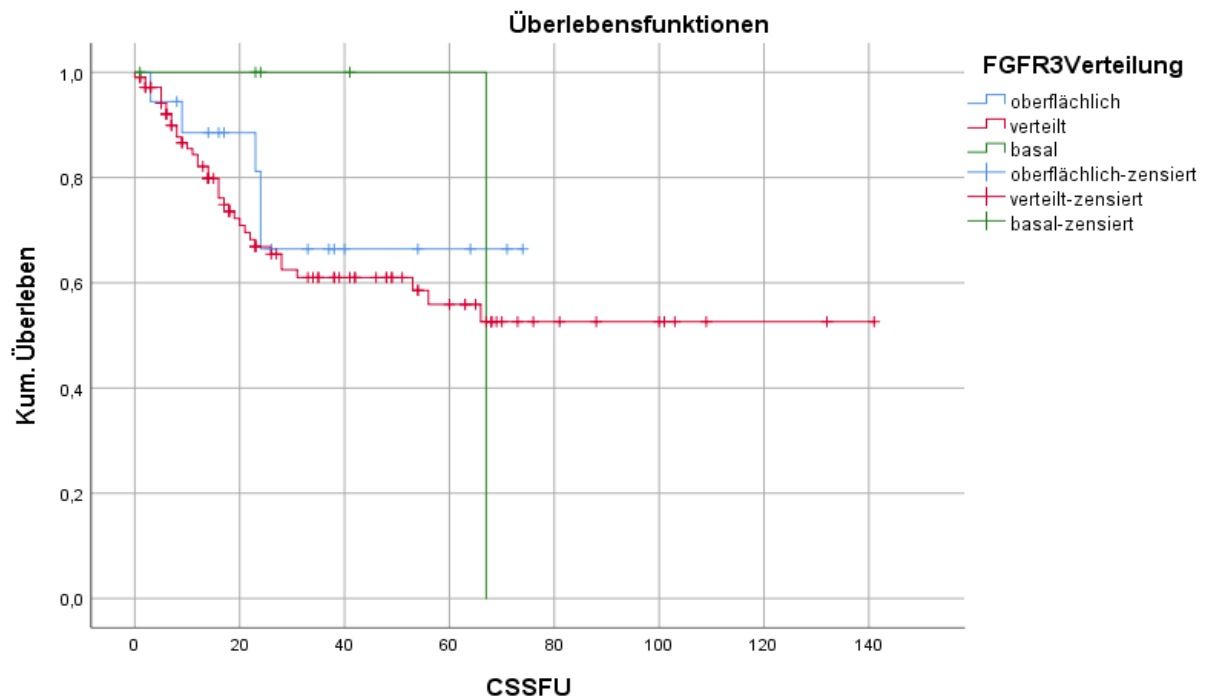


Abbildung 59: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche FGFR3-Verteilung in normalem Urothel

Nach 50 Monaten sind alle Patienten mit basaler FGFR3-Verteilung am Leben oder nicht am Tumor verstorben gegenüber ca. 66% mit oberflächlicher und ca. 61% mit verteilter urothelialer Färbung. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,633, ein Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit ist hinsichtlich basaler, verteilter oder superfizialer Färbung somit sehr unwahrscheinlich - die FGFR3-Verteilung in normalem Urothel eignet sich folglich nicht als verlässlicher prognostischer Marker.

Abbildung 60 spiegelt den Einfluss positiver oder negativer zytoplasmatischer FGFR3-Expression in normalem Urothel auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit wieder:

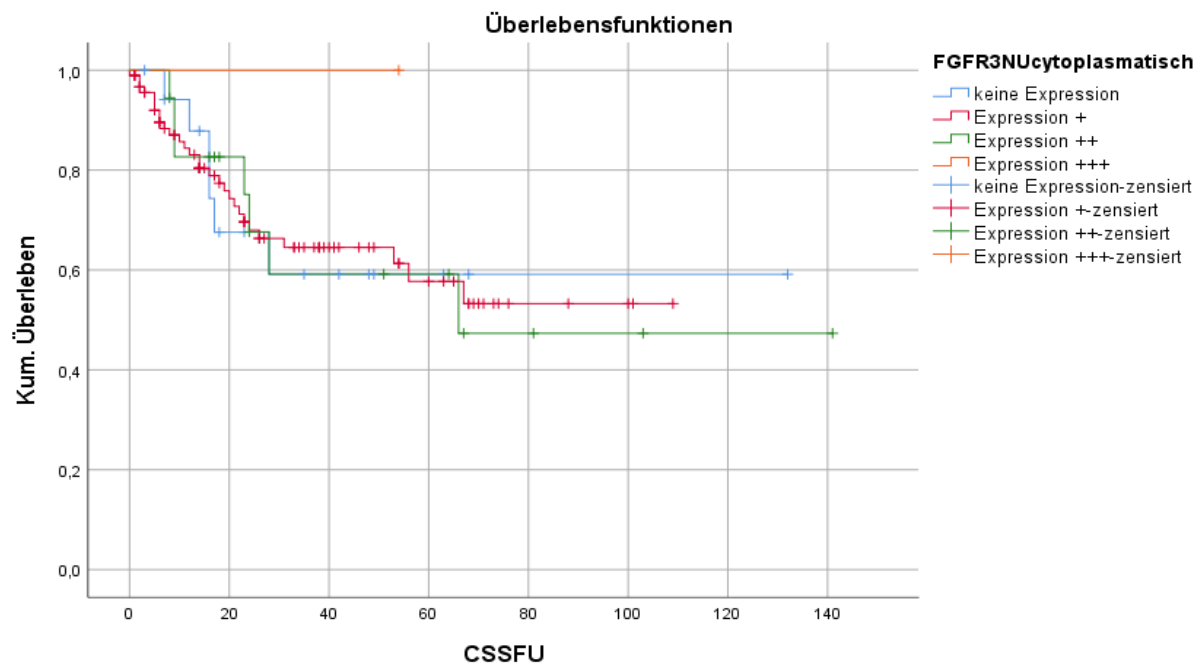


Abbildung 60: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische FGFR3-Expression in normalem Urothel

Nach 50 Monaten sind alle Patienten mit starker zytoplasmatischer FGFR3-Expression in normalem Urothel am Leben oder nicht am Tumor verstorben versus ca. 65% mit schwacher und 60% mit mäßiger und negativer Expression. Der Log-Rank-Test zeigte sich mit einem p-Wert von 0,919 eindeutig nicht signifikant. Die zytoplasmatische FGFR3-Expression in normalem Urothel ist zur Vorhersage des onkologischen Verlaufes daher unbrauchbar.

Abbildung 61 stellt den Einfluss positiver versus negativer zytoplasmatischer FGFR3-Expression in Tumorgewebe auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

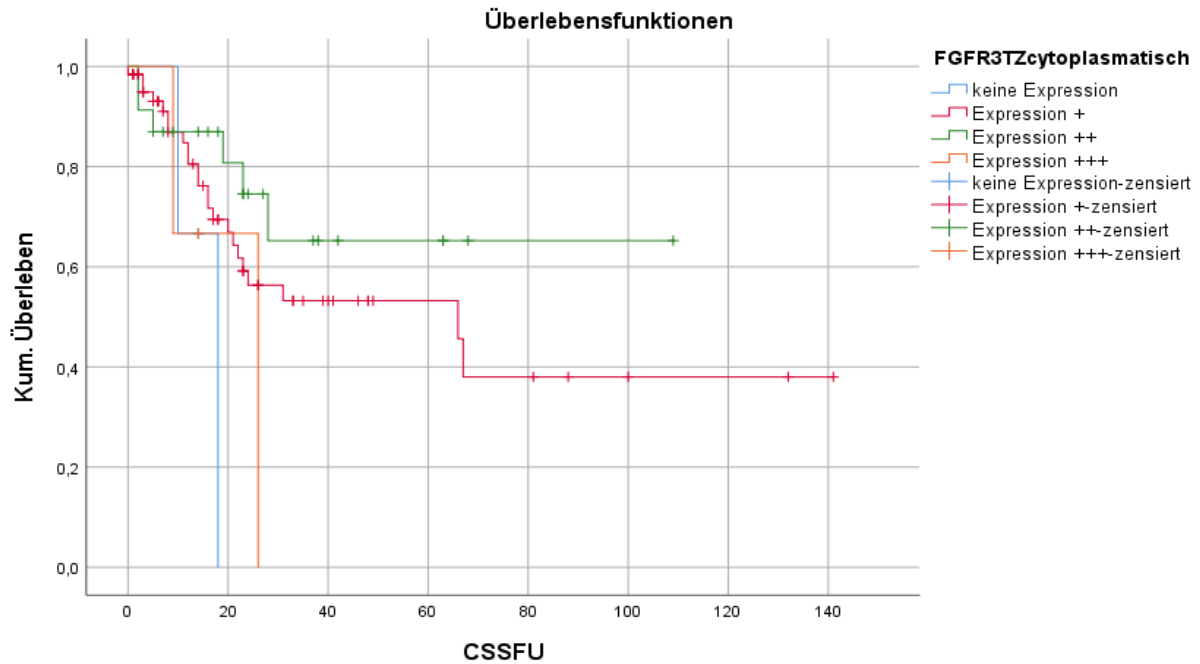


Abbildung 61: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die zytoplasmatische FGFR3-Expression in Tumorgewebe

Das krebspezifische Follow Up der Patienten mit starker sowie negativer Expression endet mit ca. 20 Monaten. Nach 100 Monaten sind ca. 65% der Patienten mit mäßiger und ca. 39% der Patienten mit schwacher Expression am Leben oder nicht tumorbedingt verstorben. Der Log-Rank-Test ergab mit einem p-Wert von 0,172 keine statistische Signifikanz. Die zytoplasmatische FGFR3-Expression in Tumorgewebe ist somit als prädiktiver Marker ungeeignet.

Abbildung 62 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer FGFR3-Expression in normalem Urothel auf die krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

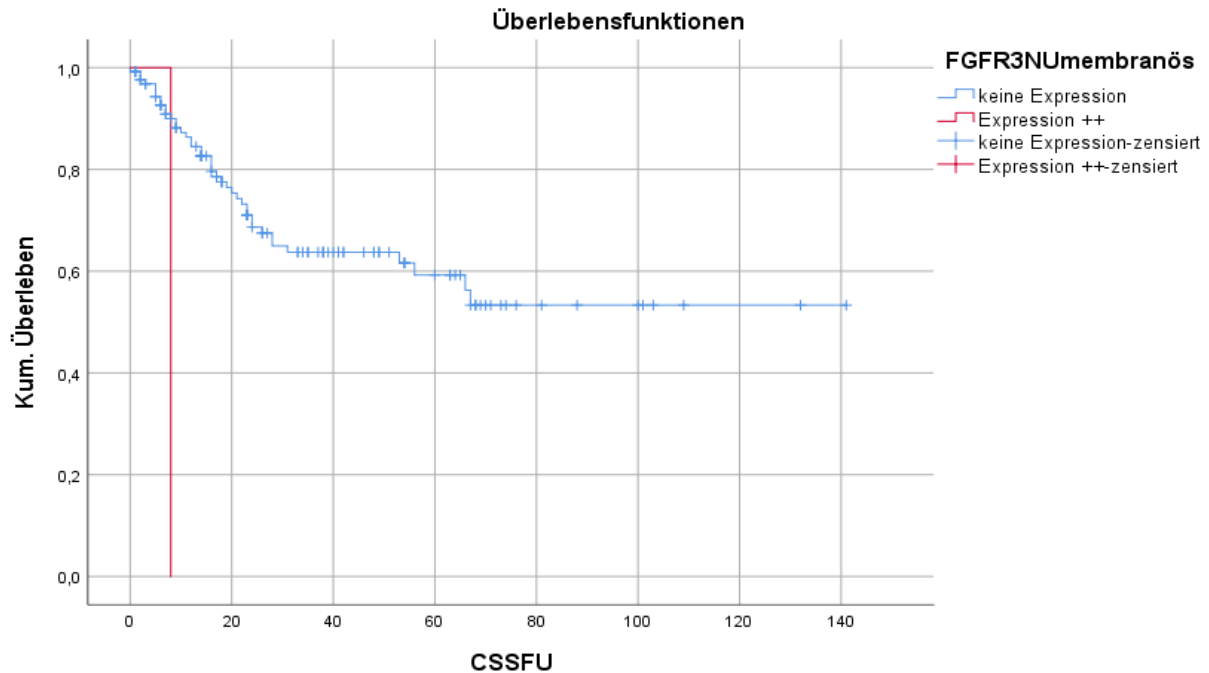


Abbildung 62: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre FGFR3-Expression in normalem Urothel

Ein Präparat zeigt in der Analyse eine mäßige membranäre FGFR3-Expression; der zugehörige Patient verstirbt mit knapp 10 Monaten infolge des Tumors. Die restlichen Präparate zeigen keine FGFR3-Expression in normalem Urothel; nach 100 Monaten sind ca. 54% dieser Patienten am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von 0,008, ein Unterschied in den Überlebenskurven ist somit statistisch wahrscheinlich. Die membranäre FGFR3-Expression in normalem Urothel kommt somit zur Vorhersage des onkologischen Verlaufs in Betracht.

Abbildung 63 stellt den Einfluss unterschiedlich starker membranärer FGFR3-Expression in Tumorgewebe auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit dar:

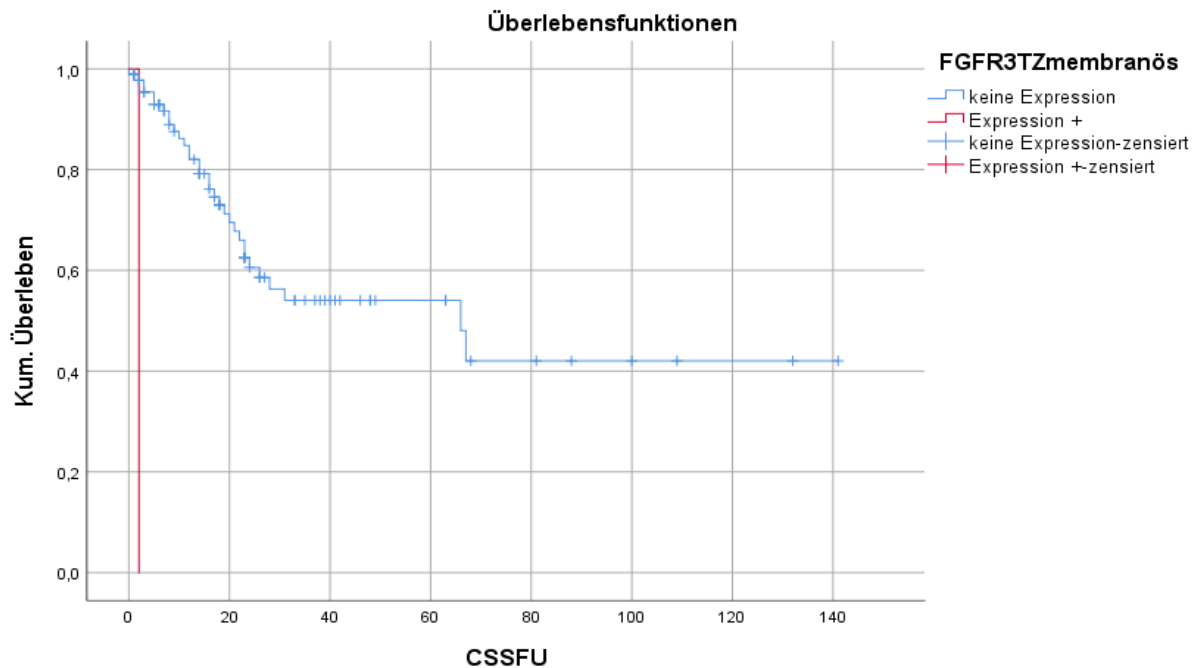


Abbildung 63: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre FGFR3-Expression in Tumorgewebe

Ein Patient zeigt in der Analyse eine schwache membranäre FGFR3-Expression in Tumorgewebe, er verstirbt nach knapp 2 Monaten krebsspezifischem Follow Up. Die restlichen Patienten zeigen keine FGFR3-Expression in Tumorgewebe; nach 100 Monaten sind ca. 42% dieser Patienten am Leben oder nicht am Tumor verstorben. Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert von unter 0,001, ein Unterschied in den Überlebenskurven ist somit statistisch sehr wahrscheinlich. Die membranäre FGFR3-Expression in Tumorgewebe könnte somit ebenfalls als verlässlicher Prognosemarker geeignet sein.

4 Diskussion

4.1 Klinische und histopathologische Parameter des Patientenkollektivs

Wie unter dem Punkt Epidemiologie erwähnt, liegt laut Literaturangaben das mittlere Erkrankungsalter (median) des Harnblasenkarzinoms in Deutschland bei ca. 75

Jahren (74 für Frauen und 76 für Männer). Das für diese Arbeit untersuchte Patientenkollektiv ist insgesamt etwas jünger, das mediane Erkrankungsalter liegt hier bei 69 Jahren. Weiterhin sind ca. 1/5 des für diese Arbeit untersuchten Kollektivs Frauen, etwas weniger als die Inzidenz bei Frauen in der Literaturangabe (Frauenanteil von ca. 1/3 (5)). Die für diese Studie 146 inkludierten Patienten stellen dennoch ein repräsentatives Patientenkollektiv dar. Die Auswertung der krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich des Geschlechts in dieser Arbeit zeigt eine tendenziell niedrigere Überlebensrate bei Männern; in der Literatur wird von einer höheren Überlebensrate bei Männern aufgrund der günstigeren Verteilung der Tumorstadien gesprochen (5). Dieser Aspekt ist sicherlich mitunter auf die verhältnismäßig kleine Patientengruppe zurückzuführen, zudem ist das Patientenkollektiv ortsspezifisch, d.h. alle stammen aus oder dem Umkreis Regensburg – spezielle lokale Gegebenheiten können somit die Parameter beeinflussen. Weiterhin zeigt sich für das Regensburger Kollektiv eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit bei Rauchern oder ehemaligen Rauchern – scheinbar widersprüchlich zu der Tatsache, dass Rauchen der größte bekannte Risikofaktor des Harnblasenkarzinoms ist (8). Bei den 42,5% der Nichtraucher könnten allerdings gleichzeitig auch andere, statistisch in dieser Arbeit nicht erfasste Risikofaktoren vorhanden gewesen sein wie beispielsweise berufsbedingte Schadstoffexposition, Einnahme von Harnblasenkarzinom auslösenden Medikamenten oder Vorhandensein von chronischen Zystitiden in der Vorgeschichte. Aufgrund dessen könnte das Ergebnis hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Nichtrauchern entsprechend verzerrt worden sein. Zudem erfolgte in dieser Studie keine Unterscheidung hinsichtlich Dauer und Intensität des Rauchens. Neben den bereits genannten Limitationen dieser Arbeit ist auch die vergleichsweise geringe Größe des Patientenkollektivs zu berücksichtigen. Insgesamt ist also die Übertragung der Ergebnisse auf das Gesamtkollektiv mit Vorsicht zu werten.

Wie eingangs bereits erwähnt, dient bis dato hauptsächlich der TNM-Status zur Prognoseeinschätzung und als Kriterium zu Therapieentscheidungen. Unsere Daten bestätigen die Aussagekraft dieser Parameter – pT, pN, cM und Metastasenstatus zeigen in der Auswertung eine signifikante Korrelation mit einem schlechterem krebsspezifischen Überleben, genau wie der Resektionsstatus und das Auftreten eines Lokalrezidivs. Das gleichzeitige Vorhandensein eines CIS im Tumorpräparat im

Langzeitverlauf (d.h. ab ca. 52 Monate) ist ebenso mit einer schlechteren krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ($p = 0,16$). Bisher wurden bereits einige Studien publiziert, die ebenfalls eine Assoziation des assoziierten CIS mit der krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit bestätigen. So in der Studie von Kimura, Mari et al. 2019: bei Harnblasenkarzinompatienten mit organbeschränkter Erkrankung sei das begleitende Carcinoma in situ in der Gewebeprobe der radikalen Zystektomie ein Prognosemerkmal für das rezidivfreie Überleben und die krebsspezifische Mortalität (70). Eine weitere Studie von Wheat, Weizer et al. 2012 zeigt, dass auch bei Patienten mit organbeschränktem Urothelkarzinom des oberen Harntrakts das Vorhandensein eines gleichzeitigen CIS mit einem höheren Rezidivrisiko und höherer krebsspezifischer Mortalität verbunden ist (71). Allerdings konnte in einer jüngst durchgeführten Metaanalyse von Lijin et al. der prognostische Wert des CIS beim Harnblasenkarzinom nicht abschließend belegt werden und dürfe nicht auf die Risikostratifizierung angewendet werden (72).

Die Auswertung des ECOG-Status und der ASA-Klassifikation hinsichtlich des krebsspezifischen Überlebens CSS zeigte in dieser Studie ebenfalls eine (allerdings jeweils statistisch nicht signifikante) negative Korrelation. Da der ECOG-Status im Allgemeinen den physischen Zustand von Krebspatienten beschreibt und die ASA-Klassifikation die Schwere der Komorbiditäten und der vorhandenen Leistungseinschränkungen widerspiegelt, geht also in dieser Studie ein schlechter physischer Ausgangszustand und eine hohe Komorbidität mit einer kürzeren krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit einher. So zeigt auch die Studie von Hara, Matsuyama et al. 2016, dass der ECOG-Status bei über 75-jährigen Patienten mit dem Gesamtüberleben nach radikaler Zystektomie assoziiert zu sein scheint (73). Auch Boorjian, Kim et al. 2013 fanden in einer retrospektiven Studie heraus, dass der Komorbiditätsstatus sowohl das perioperative Sterberisiko, als auch das 5-Jahres-Überleben nach radikaler Zystektomie vorhersagt (74).

Bezüglich der Harnableitung zeigen in der dieser Arbeit die kontinenten Ableitungen Indiana-Pouch und Ileumneoblase bessere krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit als inkontinente Harnableitungen wie das Ileumconduit oder die Ureterokutaneostomie ($p = 0,00004$). Dies ist sehr wahrscheinlich dadurch begründet, dass bei kurativer Intention ein kontinenter (orthotoper) Harnblasenersatz bevorzugt angelegt wird, während beispielsweise die inkontinente kutane

Harnableitung meist bei palliativer Absicht oder bei schweren Komorbiditäten präferiert wird (75). Patienten, bei denen man sich also beispielsweise für eine Ileumconduit-Anlage entschieden hat, haben im Allgemeinen auch ein fortgeschrittenes pTNM-Stadium, keinen R0-Resektionstatus, möglicherweise auch ein Lokalrezidiv oder einen höheren ECOG- oder ASA-Status. Bezüglich der Harnableitung ist die Patientengruppe also in gewissem Maße bereits vorselektiert.

4.2 E-Cadherin

Insgesamt zeigt sich in dieser Arbeit zwar ein Rückgang der zytoplasmatischen und membranären E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe versus normalem Urothel als Zeichen einer EMT während der Tumorgenese (siehe deskriptive Expressionsanalyse), der E-Cadherin-Verlust (also eine negative E-Cadherin Expression in Tumorgewebe) geht allerdings nicht mit einer schlechteren krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit einher, wie viele Studien bereits gezeigt haben: So stellten Ziaran, Harsanyi et al. in ihrer Studie 2020 fest, dass unter anderem die E-Cadherin-Expression in Urothelkarzinomen klar assoziiert ist mit CSS, PFS und RFS; für die Tumorstadien pTa und pT1 ergab sich hier ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben (PFS) bei Patienten mit geringerer E-Cadherin-Expression (76). Auch eine Metaanalyse von Xie, Li et al. 2017 zeigte, dass eine verminderte E-Cadherin-Expression beim Harnblasenkarzinom mit schlechterem OS, PFS und RFS assoziiert ist und daher E-Cadherin als brauchbarer Biomarker dienen könne (77). In dieser Arbeit zeigt sich gegenteilig dazu eher die Tendenz, dass eine negative (membranäre) E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe mit einer besseren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht, allerdings ist dieses Ergebnis mit einem p-Wert von 0,182 statistisch nicht signifikant. Einige Studien unterstützen allerdings auch dies: so zeigte eine immunhistochemische Untersuchung von Yu, Zhang et al. 2010, dass eine positive E-Cadherin-Expression in Harnblasenkarzinomgewebe ein schlechteres PFS vorhersagt ($p=0,001$) und dass E-Cadherin ein unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben (OS) zu sein scheint (78).

4.3 N-Cadherin

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass N-Cadherin in zytoplasmatischem und membranärem Tumorgewebe im Gegensatz zu normalem Urothel insgesamt vermindert exprimiert wird, ähnlich wie bei E-Cadherin. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, stützt dieses Ergebnis auf den ersten Blick nicht die Theorie des Cadherin-Switches während der Embryo- bzw. Tumorgenese, nach der eine verminderte E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe mit erhöhter N-Cadherin Expression einher geht (29,32,69,79). Allerdings geht laut Derycke, Bracke 2004 nicht bei allen Tumorarten die Karzinogenese gleichzeitig mit einer N-Cadherin-Erhöhung einher – es gebe auch Tumoren, bei denen N-Cadherin vermindert exprimiert wird: beispielsweise bei Metastasen des Osteosarkoms, beim muzinösen Zystadenom des Ovars oder beim Onkozytom der Niere (79). Aber auch beim Urothelkarzinom der Harnblase kommt eine doppelt negative Expression von E- und N-Cadherin durchaus vor, wie eine Studie von Luo, Zhu et al. 2016 zeigt: die biologischen Eigenschaften von Blasenkrebszellen mit doppelt negativer Expression von E- und N-Cadherin lagen den Untersuchungen zufolge zwischen denen, die eine E-Cadherin-positive und N-Cadherin-negative Expression und solchen Blasenkrebszellen, die eine E-Cadherin-negative und N-Cadherin positive Expression zeigten – daraus schlossen Luo, Zhu et al., dass der Status der doppelt negativen Expression am Prozess der EMT bei der Pathogenese des Urothelkarzinoms der Blase beteiligt sein kann (80). So könnte auch in dieser Studie der gleichzeitige Verlust von E- und N-Cadherin-Expression möglicherweise als Teilprozess der EMT verstanden werden.

N-Cadherin wurde bereits von mehreren Studien als Marker vorgeschlagen, um die klinische Entscheidungsfindung und Therapie beim Harnblasenkarzinom zu unterstützen: so war beispielsweise in einer Studie von Abufaraj, Haitel et al. 2018 eine N-Cadherin-Expression mit Merkmalen einer biologisch und pathologisch nachteiligen Erkrankung und einem schlechteren RFS vergesellschaftet (69). Auch Muramaki, Miyake et al. 2012 legten nahe, dass der Verlust von E-Cadherin und der Zugewinn an N-Cadherin-Expression bei Patienten mit nicht muskelinvasivem Harnblasenkarzinom scheinbar signifikant mit dem Auftreten eines postoperativen Rezidivs verbunden sind (81); 2011 zeigten sie außerdem, dass bei Patienten mit Urothelkarzinom der oberen Harnwege ein Anstieg von N-Cadherin signifikant mit

dem Wiederauftreten der Krankheit nach Nephroureterektomie assoziiert zu sein scheint (82). Passend zu diesen Studien besteht in dieser Arbeit möglicherweise eine (mit einem p-Wert von 0,088 statistisch annähernd signifikante) Assoziation zwischen N-Cadherin-Expression und CSS: je höher die membranäre N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe, desto schlechter die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit.

4.4 β -Catenin

Die deskriptive Expressionsanalyse ergab eine verminderte zytoplasmatische sowie verminderte membranäre Expression sowie einen Verlust der membranären Expressionsstärke von β -Catenin in Tumorgewebe versus normalem Urothel. Dies könnte in Zusammenschau mit dem gleichzeitigen Verlust an E-Cadherin bedeuten, dass es in der Tat zu einem Stabilitätsverlust der interzellulären Haftverbindungen während der EMT im Rahmen der Tumorentstehung kommt und daher β -Catenin als Plaqueprotein vor allem membranär vermindert exprimiert wird. Es wurde bereits mehrfach publiziert, dass unter anderem der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg Transkriptionsfaktoren induziert, die wiederum EMT einleiten bzw. die Gen-Expression hin zu mesenchymalem Phänotyp ändern (28,83): demnach transferiert im Zuge dessen β -Catenin in den Nucleus und aktiviert dort mittels LEF-1 (lymphoid enhancer binding factor-1) die Expression von Genen, die das Überleben der Zelle sichern sowie deren Wachstum und Migration fördern; β -Catenin habe also onkogenes Potential (28,84,85). Eine immunhistochemische nukleäre Expression weist β -Catenin in dieser Studie allerdings weder in normalem Urothel noch in Tumorgewebe auf, möglicherweise spielen hier zur Induktion der EMT andere Signalwege eine Rolle.

Bei Betrachtung der Auswirkungen der β -Catenin-Expression auf das CCS erbringt diese Arbeit keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Allenfalls in Tumorgewebe besteht die Tendenz, dass eine negative membranäre β -Catenin-Expression mit einem besseren CCS einher geht, allerdings liegt dieses Ergebnis mit einem p-Wert von 0,120 über dem Signifikanzniveau von 5%. Dies wäre außerdem widersprüchlich zu der Theorie, dass ein Verlust der Zelladhäsionsverbindungen mit

EMT und gleichzeitig schlechterer Prognose assoziiert ist: 2008 zeigten Bryan, Atherfold et al., dass neben E-Cadherin auch eine signifikant verminderte Expression von β -Catenin mit einem Progress beim Urothelkarzinom einher geht (86). Gegensätzlich dazu ergab allerdings eine neuere Metaanalyse von Ren, Yang et al. 2020, dass ein hohes Expressionsniveau von β -Catenin mit einem höheren TNM-Stadium und höherem pathologischem Tumorgrad einher geht sowie gleichzeitig mit schlechterem PFS; β -Catenin könne laut Ren, Yang et al. demnach möglicherweise als prognostischer Marker für das Harnblasenkarzinom fungieren (87).

4.5 γ -Catenin

Bezüglich eines prognostischen Markers ist γ -Catenin, insbesondere beim Harnblasenkarzinom, bisher weitaus weniger häufig untersucht worden als beispielsweise die Cadherine. Kashibuchi, Tomita et al. konnten 2006 in ihrer immunhistochemischen Untersuchung von 61 Nephroureterektomiepräparaten keine signifikante Korrelation zwischen der γ -Catenin-Expression und einem Urothelkarzinomrezidiv aufzeigen; lediglich E-Cadherin wurde in ihrer Studie als möglicher prognostischer Marker für Karzinome des oberen Harntraktes vorgeschlagen (88).

Im Gegensatz dazu detektierten Clairotte, Lascombe et al. 2006 in einer immunhistochemischen Analyse γ -Catenin als unabhängigen Prognosemarker für PFS bei Patienten mit T1-Urothelkarzinom der Harnblase (89). Auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit stellt im Speziellen die membranäre γ -Catenin-Expression in normalem Urothel möglicherweise einen brauchbaren prognostischen Marker dar: eine negative membranäre Expression des Markers in normalem Urothel geht mit geringerem krebsspezifischem Überleben einher ($p=0,001$); in Tumorgewebe zeigt sich umgekehrtes Verhältnis, eine starke Expression geht hier mit besserem CSS einher, allerdings besteht hier keinerlei statistische Signifikanz. Anscheinend ist es also durchaus sinnvoll und von Bedeutung, zwischen Tumorgewebe und (angrenzendem) normalem Urothel zu unterscheiden. Es sollten daher noch weitere Studien durchgeführt werden, zum einen um die Relevanz der Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und angrenzendem normalem Urothel näher zu

untersuchen, zum anderen um die Studienlage bezüglich membranärer γ -Catenin-Expression in normalem Urothel als brauchbaren Prognosemarker zu erhärten. Auch die Arbeit von Rieger-Christ, Ng et al. 2005 bekräftigt das Ergebnis dieser Studie: demnach habe γ -Catenin tumorsuppressive Eigenschaften – die Stummschaltung des Plakoglobin-Gens sei ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression bei fortgeschrittenen Karzinomen der Harnblase. Umgekehrt werde durch die Wiederherstellung der Plakoglobinexpression in Harnblasenkarzinomzellen die Zellmigration sowie das tumorigene Potential unterdrückt (90).

Auch die Verteilung der Markerexpression in normalem Urothel (basal, gleich, superfizial) sollte künftig bezüglich prognostischer Relevanz näher untersucht werden: ähnlich wie bei E-Cadherin zeigen auch die N-Cadherin- sowie γ -Catenin-Verteilung in normalem Urothel, dass eine basale Expression mit besserem CSS einher geht als bei gleicher oder superfizialer Expression, allerdings liegt auch hier das Signifikanzniveau jeweils deutlich über 5% (42,0% bei E-Cadherin, 18,7% bei N-Cadherin und 62,7% bei γ -Catenin). Verlässliche prognostische Relevanz haben also nach dieser Studie weder die N-Cadherin-, E-Cadherin- noch die γ -Catenin-Verteilung.

4.6 TIMP1

Die deskriptive Expressionsanalyse ergab einen membranären TIMP1-Expressionsverlust in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Urothel von 46% bei gleichzeitigem Expressionsanstieg im Zytoplasma um 49%. Auch Yano, Nakamoto et al. untersuchten 2002 die Lokalisation von TIMP1-mRNA in Urothelkarzinomen. Mittels in-situ-Hybridisierung fanden sie ebenfalls heraus, dass TIMP1-mRNA im Zytoplasma von Urothelkarzinomzellen exprimiert wird. Gleichzeitig zeigten sie, dass eine starke TIMP1-mRNA-Expression mit schlechter Prognose einher geht (91). Passend dazu konnte unsere Studie ebenfalls belegen, dass bei negativer zytoplasmatischer TIMP1-Expression (sowohl in Tumorgewebe als auch in normalem Urothel) eine bessere krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit besteht, allerdings ohne den Nachweis einer statistischen Signifikanz ($p=0,164$ bei Tumorgewebe und $p=0,152$ bei normalem Urothel).

Zahlreiche weitere Studien erforschten den prognostischen Wert von TIMPs beim Urothelkarzinom und kamen zu einem ähnlichen Ergebnis: Hara, Miyake et al. untersuchten 2001 die TIMP2-Expression bei Patienten mit Tumorrezidiv im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv: bei Patienten mit Rezidiv sei diese deutlich überexprimiert. Sie postulierten daher, dass MMP-9 und TIMP2 geeignete Marker sein könnten, um ein Rezidiv bei Patienten mit nicht-invasivem-Urothelkarzinom vorherzusagen (92). Miyata, Kanda et al. 2004 schlugen TIMP1 als brauchbaren unabhängigen Prognosemarker vor: sie fanden in einer immunhistochemischen Analyse von Patienten mit Urothelkarzinom des oberen Harntraktes heraus, dass eine positive TIMP1-Expression mit höherem pT-Stadium korreliert (93). Auch bei Karzinomen anderen Ursprungs konnten etliche klinische Studien zeigen, dass eine aberrante Expression von TIMP1 mit einer ungünstigen Prognose bei Tumoren einher geht; so entdeckten beispielsweise Song, Xu et al. 2016, dass in Gewebeproben des Kolonkarzinoms TIMP1 überexprimiert wird und signifikant mit Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, Gefäßinvasion sowie Tumorstadium assoziiert ist. Sie schlugen TIMP1 als potenziellen prognostischen Marker für das Kolonkarzinom vor (50). Nicht nur Gewebeproben von Tumoren wurden bisher untersucht, auch beispielsweise in Blutplasma zeigte sich, dass beim Mammakarzinom eine hohe präoperative Konzentration von TIMP1 prädiktiv für ein systemisches Rezidiv sei (40). Ebenfalls gewonnen aus Blutplasma, identifizierten Staack, Badendieck et al. 2006 auf ihrer Suche nach einem nicht-invasiven Marker zur Diagnostik des Urothelkarzinoms der Harnblase den Marker MMP2 als statistisch signifikant, und zwar insbesondere in Kombination mit MMP9 und TIMP1 - der klinische Nutzen von MMPs und TIMPs alleine sei wiederum begrenzt (44). Auch Studien zu TIMP1 aus Urin zeigten ähnliche Ergebnisse: Ricci, Bruzesse et al. entdeckten 2015 in einer Studie mit 41 Harnblasenkarzinompatienten, dass die TIMP1-Werte im Urin bei Patienten mit high-grade Karzinomen signifikant höher waren als bei Patienten mit low-grade Tumoren und schlugen TIMP1 aus Urin als brauchbaren, nicht-invasiven Biomarker vor, um umfassendere klinische Informationen zur Auswahl der optimalen Therapiestrategie zu gewinnen (94). Grundsätzlich ist jedoch zu beachten, dass eine Vergleichbarkeit von TIMP1-Expression in Gewebeproben mit dem TIMP1-Spiegel im Blutplasma oder Urin nicht automatisch valide ist: Sørensen, Schrohl et al. zeigten, dass eine Korrelation zwischen TIMP1 in Tumorgewebeproben und dem TIMP1-Spiegel im Blut nicht

gegeben ist; sie vermuteten, dass andere Quellen als das Tumorgewebe selbst zu den erhöhten TIMP-1-Plasmaspiegeln bei Patienten mit Kolonkarzinom beitragen könnten (95).

Gegensätzlich zu den bisher genannten Studien, die eine positive TIMP1-Expression größtenteils mit schlechtem Outcome assoziierten, fanden beispielsweise Wieczorek, Jablonowski et al. 2015 heraus, dass die TIMP1-Genexpression bei Patienten zum Zeitpunkt eines Rezidivs gegenüber dem initialen Diagnosezeitpunkt signifikant verringert war ($p=0,003$). Sie hielten es für möglich, dass die Genexpression von TIMP1 ein wichtiger Faktor für das Auftreten eines frühzeitigen Rezidivs beim Harnblasenkarzinom sein könnte (96). Ebenfalls widersprüchlich zur erst genannten Studie fanden Chuang, Pang et al. 2010 keine signifikante Korrelation zwischen TIMP1-Expression und Tumorgrad oder –stadium beim Urothelkarzinom der Harnblase (97).

4.7 FGFR3

Wie bereits erwähnt, besteht anscheinend ein funktioneller Zusammenhang zwischen N-Cadherin mit dem FGF-Rezeptor, was zu Signalen führt, die bedeutend für die Regulation der Zellmigration sind (29,51). In der malignen Melanom Studie von Li, Zhang et al. 2019 führte ein Ausschalten des Gens, das für FGFR3 codiert, zu einer Herunterregulierung von E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin, also von klassischen EMT-Markern. Zudem sei die mRNA-Expression von FGFR3 in malignen Melanomgeweben höher als in gesunden Geweben (57). Auch in dieser Arbeit ist eine höhere zytoplasmatische FGFR3-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Urothel zu verzeichnen. Allerdings besteht gleichzeitig eine verringerte E- und N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe. Die Studie von Li, Zhang et al. zeigte zudem, dass die FGFR3-Expression in kutanen malignen Melanomgeweben positiv mit der Breslow-Dicke und der Lymphknotenmetastasierung korreliere; und bei Versuchen mit Xenotransplantatmäusen verringerte der induzierte Abbau von FGFR3 das Tumorstadium und die Metastasierung; eine Fehlregulation von N-Cadherin und FGFR3 ist insgesamt also assoziiert mit Tumorprogress (57,99). Sung, Sun et al. 2014 zeigten ebenfalls, dass die Überexpression von FGFR3 ein

schlechtes Outcome bei Patienten mit adjuvanter Chemotherapie nach radikaler Zystektomie habe (101). Auch diese Studie kann den Aspekt, dass eine FGFR3-Überexpression mit schlechter Prognose einhergeht, bekräftigen: eine positive membranäre FGFR3-Expression geht hier sowohl in normalem Urothel ($p < 0,001$) als auch in Tumorgewebe ($p = 0,008$) mit schlechterem CSS einher.

Gegensätzlich zu den bisher genannten Studien zeigt eine immunhistochemische Analyse des FGFR3-Proteins bei Patienten mit Harnblasenkarzinom von Bertz, Abeé et al. 2014, dass eine positive FGFR3-Expression mit einer günstigen Prognose einher geht; Die FGFR3-Expression sei ein unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben (100).

Aufgrund der Anzahl und Aussagekraft bisheriger Studien bezüglich dem onkogenen Potential von aberranten FGFR-Signalen bei der Krebsentstehung ist das therapeutische Targeting von FGFs und FGFRs zudem bereits Gegenstand der Arzneimittelforschung; eine zielgerichtete Therapie gegen FGFR und dessen Signalkomponenten könnte verwendet werden, um das Tumorwachstum zu bremsen, die Angiogenese zu stoppen oder aber erworbene Resistenzen gegen Medikamente, die gegen den Tumor gerichtet sind, wieder aufzuheben (53,98).

5 Zusammenfassung

Die immunhistochemische Expressionsanalyse der einzelnen EMT-Marker erbrachte zusammenfassend folgende Ergebnisse:

E-Cadherin: Insgesamt zeigt sich in dieser Arbeit ein Verlust zytoplasmatischer und membranärer E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe versus normalem Urothel, am ehesten als Zeichen einer EMT. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression und dem krebsspezifischen Überleben kann aber weder bei der E-Cadherin-Verteilung in gesundem Urothel noch bei zytoplasmatischer oder membranärer E-Cadherin-Expression hergestellt werden. E-Cadherin scheint anhand unserer Daten entgegen einiger anderer

Studienergebnisse nicht als Marker zur Vorhersage des onkologischen Verlaufs bei Harnblasenkarzinompatienten geeignet zu sein.

N-Cadherin: Das Ergebnis der deskriptiven Expressionsanalyse stützt auf den ersten Blick nicht die Theorie des Cadherin-Switches von E-Cadherin hin zu N-Cadherin während EMT in der Tumorentstehung, da ein gleichzeitiger Verlust sowohl von E- als auch von N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe vorliegt. Allerdings könnte die doppelt negative Expression möglicherweise auch als Teilzustand der EMT gesehen werden, wie bereits zum Beispiel von Luo, Zhu et al. vorgeschlagen.

In Bezug auf das krebsspezifische Überleben besteht möglicherweise eine Korrelation zwischen membranärer N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe und CSS: je höher die membranäre Expression, desto schlechter das CSS (allerdings $p=0,088$). Dies ist bereits in einigen Studien mit statistischer Signifikanz gezeigt worden; es sollten weitere Studien durchgeführt werden, um diese Theorie zu stützen und um N-Cadherin als möglichen prognostischen Marker eingehender zu untersuchen.

β -Catenin: Die deskriptive Expressionsanalyse zeigt eine verminderte zytoplasmatische und membranäre Expression von β -Catenin in Tumorgewebe bei gleichzeitigem Verlust der membranären Expressionsstärke. Am ehesten ist dies als Verlust der interzellulären Haftverbindungen im Rahmen der EMT zu werten. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen β -Catenin-Expression und krebsspezifischem Überleben konnte in dieser Arbeit weder für Tumorgewebe noch für normales Urothel hergestellt werden.

γ -Catenin: Die deskriptive Expressionsanalyse ergab eine verminderte zytoplasmatische und membranäre Expression in Tumorgewebe. Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen membranärer γ -Catenin-Expression in normalem Urothel und CSS hergestellt werden: eine negative membranäre Expression geht hier mit geringerem krebsspezifischem Überleben einher ($p=0,001$); Möglicherweise ist die membranäre γ -Catenin-Expression in normalem Urothel geeignet, um den onkologischen Verlauf der Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase vorherzusagen.

TIMP1: Die deskriptive Expressionsanalyse zeigte einen membranären Expressionsverlust in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Urothel, gleichzeitig ist die zytoplasmatische Expression in Tumorgewebe zunehmend. Auch Yano, Nakamoto et al. 2002 lokalisierten TIMP1-mRNA im Zytoplasma von Urothelkarzinomen. Möglicherweise verlagert sich TIMP1 während dem Prozess der EMT von der Membran in das Zytoplasma. Es konnte in dieser Studie allerdings weder bei der membranären und zytoplasmatischen Expressionsstärke, noch bei der TIMP1-Verteilung ein statistisch signifikanter Zusammenhang in Bezug auf das CSS hergestellt werden. Allerdings deuten die Ergebnisse an, dass eine negative zytoplasmatische TIMP1-Expression (sowohl in Tumorgewebe als auch in normalem Urothel) mit einer besseren krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit einhergehen könnte ($p=0,164$ bzw. $p=0,152$) – insbesondere vor dem Hintergrund, dass einige Studien TIMP1 bereits als brauchbaren prognostischen Marker identifizieren konnten.

FGFR3: Insgesamt zeigt sich ein Anstieg immunhistochemischer zytoplasmatischer FGFR3-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Urothel und zugleich einen Zugewinn an zytoplasmatischer Expressionsstärke. Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen positiver membranärer FGFR3-Expression (sowohl in normalem Urothel als auch in Tumorgewebe) und dem CSS hergestellt werden, und zwar geht eine positive membranäre FGFR3-Expression sowohl in normalem Urothel als auch in Tumorgewebe mit schlechterem CSS einher. Die immunhistochemische FGFR3-Expression ist somit möglicherweise ein brauchbarer Marker, um den prognostischen Verlauf bei Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase vorherzusagen.

Schlussfolgerung:

Diese Studie konnte eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen pT ($p=0,0004$), pN ($p=0,001$), cM ($p=0,005$), Resektionsstatus ($p=0,00005$), Lokalrezidiv ($p<0,001$), Metastasenstatus ($p<0,0001$) und der krebsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit nachweisen. Außerdem zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied im krebsspezifischen Überleben bei der Auswahl der postoperativen Harnableitung ($p=0,00004$).

Zudem zeigte die Studie, dass die immunhistochemische membranäre **γ-Catenin-Expression** in normalem Urothel ein möglicher Parameter sein könnte, um den onkologischen Verlauf für Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase nach radikaler Zystektomie vorherzusagen: eine negative membranäre γ-Catenin-Expression geht demnach mit schlechterem CSS einher ($p=0,001$).

Als weiterer möglicher prognostischer Faktor ist möglicherweise die immunhistochemische membranäre **FGFR3-Expression** sowohl in normalem Urothel als auch in Tumorgewebe geeignet: eine positive membranäre Expression geht mit schlechterem CCS einher (normales Urothel: $p= 0,008$, Tumorgewebe: $p< 0,0001$).

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (5)	7
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016 (5).....	8
Abbildung 3: T-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (11).....	11
Abbildung 4: Modell der Rolle von EMT in der Tumorprogression (20)	16
Abbildung 5: Zelluläre Veränderungen, die mit EMT assoziiert sind (28)	17
Abbildung 6: Interzelluläre Haftkontakte: Aufbau eines Adhäsionskontaktes (A) und eines Desmosoms (B); aus Angst, Marcozzi et al. (36)	19
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung von Männern und Frauen mit Urothelkarzinom der Harnblase nach radikaler Zystektomie	36
Abbildung 8: Unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung der verschiedenen ECOG-Stadien	37
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung der ASA-Stadien 1-3.....	38
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf den Raucherstatus.....	39
Abbildung 11: Unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung der verschiedenen pT-Stadien.....	40
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche Überlebensverteilung in Bezug auf den pN-Status	41
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich des Vorhandenseins von Metastasen im CT	42
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf ein assoziiertes Carcinoma in situ (CIS)	43
Abbildung 15: Unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf den Resektionsstatus	44

Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich der verschiedenen postoperativen Harnableitungen.....	45
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich des Auftretens eines Lokalrezidivs.....	46
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich des Metastasenstatus	47
Abbildung 19: E-Cadherin-Expression in normalem Urothel, hier stark membranär und leicht zytoplasmatisch bei gleichmäßig betonter Färbung aller Urothelschichten.....	48
Abbildung 20: überwiegend leicht membranäre E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe	48
Abbildung 21: mäßig membranäre E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe	49
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für die krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche E-Cadherin-Verteilung in gesundem Urothel.....	51
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische E-Cadherin-Expression in gesundem Urothel.....	52
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die zytoplasmatische E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe	53
Abbildung 25: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre E-Cadherin-Expression in normalem Urothel.....	54
Abbildung 26: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre E-Cadherin-Expression in Tumorgewebe	55
Abbildung 27: N-Cadherin-Expression in normalem Urothel, hier stark membranär und leicht zytoplasmatisch	56
Abbildung 28: mäßig membranäre N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe.....	57
Abbildung 29: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche N-Cadherin-Verteilung in normalem Urothel.....	59

Abbildung 30: Krebspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische N-Cadherin-Expression in normalem Urothel.....	60
Abbildung 31: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe	61
Abbildung 32: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre N-Cadherin-Expression in normalem Urothel.....	62
Abbildung 33: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre N-Cadherin-Expression in Tumorgewebe	63
Abbildung 34: β -Catenin-Expression in normalem Urothel, hier typischerweise leicht membranär	64
Abbildung 35: β -Catenin-Expression in Tumorgewebe, hier teilweise leicht membranär	65
Abbildung 36: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche β -Catenin-Verteilung in normalem Urothel	67
Abbildung 37: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische β -Catenin-Expression in normalem Urothel	68
Abbildung 38: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die zytoplasmatische β -Catenin-Expression in Tumorgewebe	69
Abbildung 39: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre β -Catenin-Expression in normalem Urothel.....	70
Abbildung 40: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre β -Catenin-Expression in Tumorgewebe	71
Abbildung 41: γ -Catenin-Expression in normalem Urothel, hier schwach zytoplasmatisch und mäßig membranär.....	72
Abbildung 42: γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe. In diesem Beispiel zeigt sich die Expression nur fokal schwach membranär	73
Abbildung 43: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche γ -Catenin-Verteilung in normalem Urothel.....	75
Abbildung 44: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische γ -Catenin-Expression in normalem Urothel.....	76

Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe	77
Abbildung 46: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke γ -Catenin-Expression in normalem Urothel ...	78
Abbildung 47: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre γ -Catenin-Expression in Tumorgewebe	79
Abbildung 48: TIMP1-Expression in normalem Urothel, hier schwach membranär und typischerweise mit betonter Färbung der Basalmembran	80
Abbildung 49: TIMP1-Expression in Tumorgewebe, hier hauptsächlich schwach zytoplasmatisch.....	81
Abbildung 50: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche TIMP1-Verteilung in normalem Urothel	83
Abbildung 51: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische TIMP1-Expression in normalem Urothel	84
Abbildung 52: Unterschiedliche krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die zytoplasmatische TIMP1-Expression in Tumorgewebe ..	85
Abbildung 53: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die Stärke der membranären TIMP1-Expression in normalem Urothel...	86
Abbildung 54: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf unterschiedlich starke membranäre TIMP1-Expression in Tumorgewebe	87
Abbildung 55: zytoplasmatische FGFR3-Expression in normalem Urothel, hier typischerweise schwach pfefferkörnerartig verteilt	88
Abbildung 56: Superficial betonte FGFR3-Expression in normalem Urothel	89
Abbildung 57: FGFR3-Expression in Tumorgewebe, mäßig zytoplasmatisch	89
Abbildung 58: FGFR3-Expression in Tumorgewebe, schwach zytoplasmatisch	90
Abbildung 59: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die unterschiedliche FGFR3-Verteilung in normalem Urothel	92
Abbildung 60: Krebsspezifische Überlebensverteilung in Bezug auf die zytoplasmatische FGFR3-Expression in normalem Urothel	93

Abbildung 61: Krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die zytoplasmatische FGFR3-Expression in Tumorgewebe.....	94
Abbildung 62: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre FGFR3-Expression in normalem Urothel.....	95
Abbildung 63: Krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf die unterschiedlich starke membranäre FGFR3-Expression in Tumorgewebe	96

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation - Urothelkarzinom der Harnblase (12)	13
Tabelle 2: Gegenüberstellung der WHO –Klassifikationen von 1973 und 2004/2016 für nicht- invasive papilläre Karzinome (Ta).....	14
Tabelle 3: Überblick Patientenmaterial	26
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper zur IHC.....	29
Tabelle 5: verwendete Materialien zur histologischen Begutachtung, Datendokumentation und Auswertung	30
Tabelle 6: relevante Patientendaten und Untersuchungskriterien	35
Tabelle 7: Gegenüberstellung der E-Cadherin Färbung in normalem versus erkranktem Gewebe	49
Tabelle 8: Dominierendes Färbeverhalten von E-Cadherin in normalem Urothel.....	50
Tabelle 9: Gegenüberstellung der N-Cadherin-Expression in normalem versus erkranktem Urothel	57
Tabelle 10: dominierendes Färbeverhalten von N-Cadherin in normalem Urothel ...	58
Tabelle 11: Gegenüberstellung der β -Catenin-Expression in normalem versus erkranktem Gewebe	65
Tabelle 12: dominierendes Färbeverhalten von β -Catenin in normalem Urothel.....	66
Tabelle 13: Gegenüberstellung der γ -Catenin-Expression in normalem versus erkranktem Gewebe	73
Tabelle 14: dominierendes Färbeverhalten von γ -Catenin in gesundem Urothel	74
Tabelle 15: Gegenüberstellung der TIMP1-Expression in normalem Urothel versus Tumorgewebe.....	81

Tabelle 16: dominierendes Färbeverhalten von TIMP1 in normalem Urothel.....	82
Tabelle 17: Gegenüberstellung der FGFR3-Expression in normalem versus erkranktem Gewebe	90
Tabelle 18: dominierendes Färbeverhalten von FGFR3 in normalem Urothel.....	91

6.3 Abkürzungsverzeichnis

CIS	 Carcinoma in situ
CSS	 cancer specific survival
CT	 Computertomographie
ECOG	 Eastern Cooperative Oncology Group
EMT	 Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	 Extrazellulärmatrix
FGFR	 Fibroblast Growth Factor
FSP-1	 fibroblast-specific protein 1
HG-PUC	 high grade papillary urothelial carcinoma
IHC	 Immunhistochemie
ISUP	 International Society of Urological Pathology
IQR	 interquartile range
LG-PUC	 low grade papillary urothelial carcinoma
MET	 Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	 Matrix-Metalloproteinase
OS	 overall survival
PFS	 progression-free survival
RFS	 recurrence-free survival
R-Status	 Resektionsstatus
TIMP	 Tissue inhibitor of metalloproteinase
WHO	 World Health Organization
α-SMA	 α- smooth muscle actin

7 Literaturverzeichnis

1. Kühnel W. Taschenatlas Histologie. 12th ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2008. 536 p.
2. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2012. 680 p. ger.
3. Hautmann R, Gschwend JE. Urologie: Mit 138 Tabellen; 5th ed. Berlin [u.a.]: Springer; 2014. (Springer-Lehrbuch).
4. Jürgen Keil. Endspurt Klinik: Urologie, Dermatologie. Stuttgart: Thieme; 2014. (vol. 11).
5. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland | 2015/2016 [cited 2020 Oct 28]. Available from:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile
6. Praxis der Urologie: In 2 Bänden. 3rd ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2007. (vol. 2).
7. Sylvester RJ, van der Meijden APM, et al. 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; 49(3):466-5.
8. Freedman ND, Silverman DT, et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. JAMA. 2011; 306(7):737–45.
9. Hiddemann W, Huber H, Bartram CR. Die Onkologie: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie. Harnblasenkarzinome und andere Urothelkarzinome. Berlin: Springer; 2010. (Springer E-book Collection; vol. H. Huber: C. Bartram ; Teil 1).
10. Burger M, Catto JWF, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. Eur Urol. 2013; 63(2):234–41.
11. Rübben H, editor. Uroonkologie. 6th ed. Berlin: Springer; 2014. 883 p. ger.
12. Onkologie L. Kurzversion S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [cited 2020 Nov 3]. Available from: <https://www.leitlinienprogramm->

onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/LL_Harnblasenkarzinom_Kurzversion_1.1.pdf

13. MacLennan GT, Kirkali Z, et al. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol.* 2007; 51(4):889-97.
14. Tosoni I, Wagner U, et al. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int.* 2000; 85(1):48–53.
15. Abel PD, Henderson D, et al. Differing interpretations by pathologists of the pT category and grade of transitional cell cancer of the bladder. *Br J Urol.* 1988; 62(4):339–42.
16. Epstein JI. The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement? *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2003; 47(2):83–9.
17. Holmäng S, Hedelin H, et al. Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol.* 1999; 162(3 Pt 1):702–7.
18. Sharma P, Kini H, et al. Study of the reproducibility of the 2004 World Health Organization classification of urothelial neoplasms. *Indian J Pathol Microbiol.* 2015; 58(1):59–61.
19. Miyamoto H, Brimo F, et al. Low-grade papillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic analysis of a post-World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification cohort from a single academic center. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(8):1160–3.
20. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1420–8.
21. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *The Journal of cell biology.* 1982; 95(1):333–9.
22. Kushwaha S, Jindal D, et al. Exploring the Role of Cadherins in Epithelial–Mesenchymal Transition and Mesenchymal–Epithelial Transition-Associated Tumorigenesis. *Dental Journal of Advance Studies.* 2018; 6(02/03):45–52.
23. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol.* 2018; 13395–412.

24. Steinestel K, Eder S, et al. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical and Translational Medicine*. 2014; 3(1):17.
25. Tsai JH, Donaher JL, et al. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*. 2012; 22(6):725–36.
26. Gakis G, Stenzl A. *Molekulare Marker beim high-grade Harnblasenkarzinom*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
27. Thiery JP, Acloque H, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139(5):871–90.
28. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014; 7(344):re8.
29. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1014:155–63.
30. Wheelock MJ, Shintani Y, et al. Cadherin switching. *J Cell Sci*. 2008; 121(Pt 6):727–35.
31. Bryan RT. Cell adhesion and urothelial bladder cancer: the role of cadherin switching and related phenomena. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015; 370(1661):20140042.
32. Bryan RT, Tselepis C. Cadherin switching and bladder cancer. *J Urol*. 2010; 184(2):423–31.
33. Alberts B, Schäfer U, Häcker B. *Molekularbiologie der Zelle*. 5th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2011. 1928 p. ger.
34. Fondreville ME, Kantelip B, et al. The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urol Oncol*. 2009; 27(3):268–76.
35. Paliwal P, Arora D, et al. Epithelial mesenchymal transition in urothelial carcinoma: twist in the tale. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012; 55(4):443–9.
36. Angst BD, Marcozzi C, et al. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*. 2001; 114(Pt 4):629–41.
37. Shapiro L, Fannon AM, et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 1995; 374(6520):327–37.

38. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(8):622–34.
39. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biology.* 1995; 7(5):619–27.
40. Holdenrieder S, Stieber P. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1. In: Gressner AM, Arndt T. *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* Springer; 2018. p. 2315.
41. DE Kleiner Jr, WG Stetler-Stevenson. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Current Opinion in Cell Biology.* 1993; 5(5):891–7.
42. Liotta LA, Steeg PS, et al. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991; 64(2):327–36.
43. Polette M, Nawrocki-Raby B, et al. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2004; 49(3):179–86.
44. Staack A, Badendieck S, et al. Combined determination of plasma MMP2, MMP9, and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BMC Urol.* 2006; 619.
45. Monier F, Mollier S, et al. Urinary Release of 72 and 92 kDa Gelatinases, TIMPs, N-GAL and Conventional Prognostic Factors in Urothelial Carcinomas. *Eur Urol.* 2002; 42(4):356–63.
46. Guo L-J, Luo X-H, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 suppresses apoptosis of mouse bone marrow stromal cell line MBA-1. *Calcif Tissue Int.* 2006; 78(5):285–92.
47. Chirco R, Liu X-W, et al. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25(1):99–113.
48. D'Angelo RC, Liu X-W, et al. TIMP-1 via TWIST1 induces EMT phenotypes in human breast epithelial cells. *Mol Cancer Res.* 2014; 12(9):1324–33.
49. Kuvaja P, Talvensaaari-Mattila A, et al. High preoperative plasma TIMP-1 is prognostic for early relapse in primary breast carcinoma. *Int J Cancer.* 2008; 123(4):846–51.

50. Song G, Xu S, et al. TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35(1):148.
51. Nguyen T, Mège RM. N-Cadherin and Fibroblast Growth Factor Receptors crosstalk in the control of developmental and cancer cell migrations. *European journal of cell biology.* 2016; 95(11):415–26.
52. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell.* 2010; 141(7):1117–34.
53. Touat M, Ileana E, et al. Targeting FGFR Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(12):2684–94.
54. Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci.* 1999; 4D165-77.
55. Endspurt 2. ÄP Päd. 1st ed. Stuttgart: Thieme; 2014. 170 p.
56. Ornitz DM, Legeai-Mallet L. Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn.* 2017; 246(4):291–309.
57. Li L, Zhang S, et al. FGFR3 promotes the growth and malignancy of melanoma by influencing EMT and the phosphorylation of ERK, AKT, and EGFR. *BMC Cancer.* 2019; 19(1).
58. Hafner C, van Oers JMM, et al. High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrhic keratoses. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(11):2404–7.
59. Chesi M, Nardini E, et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* 1997; 16(3):260–4.
60. Hernández S, López-Knowles E, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol.* 2006; 24(22):3664–71.
61. Burger M, vom Dorp F. Nutzung von Markersystemen in der Behandlung des Harnblasenkarzinoms. *Urologe A.* 2011; 50(3):303–8.
62. Bakkar AA, Wallerand H, et al. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 2003; 63(23):8108–12.

63. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2015; 15(1):25–41.
64. Bertz S, Otto W, et al. Combination of CK20 and Ki-67 immunostaining analysis predicts recurrence, progression, and cancer-specific survival in pT1 urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2014; 65(1):218–26.
65. Breyer J, Gierth M, et al. Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. *World J Urol*. 2016; 34(5):709–16.
66. McConkey DJ, Choi W, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28(3-4):335–44.
67. Wallerand H, Robert G, et al. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. *Urol Oncol*. 2010; 28(5):473–9.
68. Shimazui T, Schalken JA, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res*. 1996; 56(18):4154–8.
69. Abufaraj M, Haitel A, et al. Prognostic Role of N-cadherin Expression in Patients With Invasive Bladder Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2018; 16(1):e73-e78.
70. Kimura S, Mari A, et al. Prognostic Value of Concomitant Carcinoma In Situ in the Radical Cystectomy Specimen: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol*. 2019; 201(1):46–53.
71. Wheat JC, Weizer AZ, et al. Concomitant carcinoma in situ is a feature of aggressive disease in patients with organ confined urothelial carcinoma following radical nephroureterectomy. *Urol Oncol*. 2012; 30(3):252–8.
72. Zhang L, Wu B, et al. Concomitant carcinoma in situ may not be a prognostic factor for patients with bladder cancer following radical cystectomy: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *World J Urol*. 2020; 38(1):129–42.
73. Hara T, Matsuyama H, et al. Use of preoperative performance status and hemoglobin concentration to predict overall survival for patients aged ≥ 75 years

- after radical cystectomy for treatment of bladder cancer. *International journal of clinical oncology*. 2016; 21(1):139–47.
74. Boorjian SA, Kim SP, et al. Comparative performance of comorbidity indices for estimating perioperative and 5-year all cause mortality following radical cystectomy for bladder cancer. *J Urol*. 2013; 190(1):55–60.
 75. Stein R, Hohenfellner M, et al. Urinary diversion--approaches and consequences. *Dtsch Arztebl Int*. 2012; 109(38):617–22.
 76. Ziaran S, Harsanyi S, et al. Expression of E-cadherin, Ki-67, and p53 in urinary bladder cancer in relation to progression, survival, and recurrence. *Eur J Histochem*. 2020.
 77. Xie Y, Li P, et al. Reduced E-cadherin expression is correlated with poor prognosis in patients with bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 62489–99.
 78. Yu Q, Zhang K, et al. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010; 119.
 79. Derycke LDM, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*. 2004; 48(5-6):463–76.
 80. Luo Y, Zhu Y-T, et al. Characteristics of bladder transitional cell carcinoma with E-cadherin and N-cadherin double-negative expression. *Oncol Lett*. 2016; 12(1):530–6.
 81. Muramaki M, Miyake H, et al. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer as a novel predictor of intravesical recurrence following transurethral resection. *Urol Oncol*. 2012; 30(2):161–6.
 82. Muramaki M, Miyake H, et al. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy. *Urology*. 2011; 78(6):1443.e7-12.
 83. Kim K, Lu Z, et al. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*. 2002; 26(5):463–76.
 84. Aktary Z, Alaei M, et al. Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget*. 2017; 8(19):32270–91.

85. Kim W, Kim M, et al. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*. 2013; 450(1):9–21.
86. Bryan RT, Atherfold PA, et al. Cadherin switching dictates the biology of transitional cell carcinoma of the bladder: ex vivo and in vitro studies. *J Pathol*. 2008; 215(2):184–94.
87. Ren J, Yang Y, et al. Predictive value of β -catenin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biosci Rep*. 2020; 40(9).
88. Kashibuchi K, Tomita K, et al. The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenin in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Eur Urol*. 2006; 49(5):839-45.
89. Clairotte A, Lascombe I, et al. Expression of E-cadherin and alpha-, beta-, gamma-catenins in patients with bladder cancer: identification of gamma-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T1 superficial urothelial tumors. *Am J Clin Pathol*. 2006; 125(1):119–26.
90. Rieger-Christ KM, Ng L, Hanley RS, et al. Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential. *Br J Cancer*. 2005; 92(12):2153–9.
91. Yano A, Nakamoto T, et al. Localization and expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human urothelial cancer. *J Urol*. 2002; 167(2 Pt 1):729–34.
92. Hara I, Miyake H, et al. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2001; 165(5):1769–72.
93. Miyata Y, Kanda S, et al. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology*. 2004; 63(3):602–8.
94. Ricci S, Bruzzese D, et al. Evaluation of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, NGAL and MMP-9/NGAL complex in urine and sera from patients with bladder cancer. *Oncol Lett*. 2015; 10(4):2527–32.
95. Sørensen NM, Schrohl AS, Jensen V, et al. Comparative studies of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in plasma, serum and tumour tissue extracts

- from patients with primary colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol*. 2008; 43(2):186–91.
96. Wieczorek E, Jablonowski Z, et al. MMP, VEGF and TIMP as prognostic factors in recurring bladder cancer. *Clin Biochem*. 2015; 48(18):1235–40.
97. Chuang C-K, Pang S-T, et al. Profiling of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases proteins in bladder urothelial carcinoma. *Oncol Lett*. 2010; 1(4):691–5.
98. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(2):116–29.
99. Tiong KH, Mah LY, et al. Functional roles of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) signaling in human cancers. *Apoptosis*. 2013 Dec; 18(12):1447-68.
100. Bertz S, Abeé C, et al. Increased angiogenesis and FGFR protein expression indicate a favourable prognosis in bladder cancer. *Virchows Arch*. 2014 Dec; 465(6):687-95.
101. Sung JY, Sun JM, et al. FGFR3 overexpression is prognostic of adverse outcome for muscle-invasive bladder carcinoma treated with adjuvant chemotherapy. *Urol Oncol*. 2014 Jan; 32(1):49.e23-31.

8 Danksagung

Mit dem Abschluss dieser Dissertation gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Michael Gierth, der mir das sehr interessante Thema überlassen hat und mich während des gesamten Zeitraumes der Erstellung mit Rat und Tat begleitet und unterstützt hat.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Wolfgang Otto für die Erstellung der Statistik aus den erhobenen Daten sowie die eingehende Beratung.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Florian Weber für die pathologische Einweisung und Supervision.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Urologie, die bei der Beschaffung und Färbung der histologischen Präparate mitgewirkt haben.

Zu guter Letzt, aber nicht minder herzlich, gebührt mein Dank meiner Familie sowie meinen Freunden, die mich während des Studiums und während der Zeit der Anfertigung der Dissertation begleitet und unterstützt haben.

9 Lebenslauf

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