

**Immunhistochemische Untersuchungen an  
muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinomen zur  
Aufklärung der klinischen Bedeutung von PTOV1 und  
XPA-210**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Teepe, Katharina Lisa Maria**

**2016**

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Schwentner

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Beckert

***Für meinen Vater***

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Harnblasenkarzinom.....	10
1.1.1 Epidemiologie.....	10
1.1.2 Pathologie .....	11
1.1.3 Klassifikation .....	11
1.1.3.1 TNM.....	11
1.1.3.2 Grading.....	14
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese .....	15
1.1.5 Klinik.....	15
1.1.6 Diagnostik und Staging .....	16
1.1.6.1 Zystoskopie .....	16
1.1.6.2 Urinzytologie.....	16
1.1.6.3 Molekulare Harnblasenkarzinom-Marker.....	17
1.1.7 Therapie .....	17
1.1.8 Prognose.....	19
1.2 Marker.....	21
1.2.1 Thymidinkinase 1 / XPA-210.....	21
1.2.1.1 Das Enzym .....	21
1.2.1.2 Studienlage.....	22
1.2.2 PTOV1 .....	23
1.2.2.1 Das Protein.....	23
1.2.2.2 Vergleich mit Ki-67 .....	24
1.2.2.3 Studienlage.....	24
1.3 Fragestellung / Zielsetzung.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Ethik.....	28
2.2 Datenschutz.....	28
2.3 Studienkollektiv .....	29
2.3.1 Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Cystektomie.....	29

2.3.2 Erhebung des postoperativen Follow-up.....	30
2.4 Paraffingewebe .....	30
2.5 TMA .....	31
2.5.1 Funktionsprinzip .....	31
2.5.2. Durchführung .....	33
2.6 Immunhistochemie.....	34
2.6.1 Funktionsprinzip .....	34
2.6.2 Immunhistochemische Färbungen .....	36
2.6.2.1 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mittels MAB anti TK1 XPA-210.....	36
2.6.2.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mittels Rabbit Anti-PTOV1-AK .....	38
2.6.3 Auswertung der Immunhistochemie.....	39
2.6.3.1 Dokumentation .....	39
2.6.3.2 Mikroskopische Evaluation der immunhistochemischen Färbungen .....	39
2.6.3.2.1 Evaluationskriterien für XPA-210 .....	40
2.6.3.2.2 Evaluationskriterien für PTOV1.....	40
2.6.3.2.3 Bestätigung der Dignität.....	41
2.6.4 Statistische Auswertung.....	42
3. Ergebnisse .....	44
3.1 Patientenkollektiv:.....	44
3.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung:.....	45
3.1.2 TNM-Stadium und Grading .....	46
3.1.3 Weitere Parameter .....	46
3.2. Beschreibung der Expression und der zellulären Verteilung.....	48
3.2.1 XPA-210.....	48
3.2.1.1 Deskription.....	48
3.2.1.2 Statistische Auswertung .....	50
3.2.1.2.1 Verteilung der Zielgröße Zellzahl/100 .....	51
3.2.1.2.2 Verteilung der Zielgröße der subzellulären Lokalisation .....	51
3.2.1.2.3 Interaktion der beiden Zielgrößen .....	51

3.2.1.2.4 Vergleich der Zielgröße Zellzahl/100 in Tumoren und Normalgewebe.....	52
3.2.1.2.5 Vergleich der Zielgröße der subzellulären Lokalisation in Tumoren und Normalgewebe .....	53
3.2.2 PTOV1 .....	54
3.2.2.1 Deskription.....	54
3.2.2.2 Statistische Auswertung .....	56
3.2.2.2.1 Verteilung der Zielgröße Färbeintensität.....	56
3.2.2.2.2 Verteilung der Zielgröße der subzellulären Verteilung.....	56
3.2.2.2.3 Interaktion der beiden Zielgrößen .....	56
3.2.2.2.4 Vergleich der Zielgröße der Färbeintensität in Tumoren und Normalgewebe.....	57
3.2.2.2.5 Vergleich der Zielgröße der subzellulären Verteilung in Tumoren und Normalgewebe .....	58
3.3 Korrelationen mit Patientencharakteristika und klinischen Daten.....	59
3.3.1 Korrelationen von XPA-210.....	59
3.3.1.1 T-Stadium .....	59
3.3.1.2 N-Stadium.....	61
3.3.1.3 M-Stadium .....	61
3.3.1.4 Grading.....	62
3.3.1.5 Resektionsausmaß.....	62
3.3.1.6 Geschlecht.....	62
3.3.1.7 Alter .....	63
3.3.2 Korrelationen von PTOV1 .....	63
3.3.2.1 T-Stadium .....	63
3.3.2.2 N-Stadium.....	64
3.3.2.3 M-Stadium .....	65
3.3.2.4 Grading.....	65
3.3.2.5 Resektionsausmaß.....	65
3.3.2.6 Geschlecht.....	65
3.3.2.7 Alter .....	65
3.4 Korrelationen mit Daten des Krankheitsverlaufes.....	66
3.4.1 Ergebnisse der Follow-up - Erhebungen.....	66

3.4.1.1 Auftreten eines Rezidives.....	66
3.4.1.2 Gesamtüberleben .....	67
3.4.1.3 Tumorspezifisches Überleben .....	67
3.4.2 XPA-210.....	67
3.4.2.1 Rezidivfreie Zeit nach Zystektomie.....	67
3.4.2.2 Tumorspezifisches Überleben .....	68
3.4.2.3 Gesamtüberleben .....	69
3.4.3 PTOV1 .....	70
3.4.3.1 Rezidivfreie Zeit nach Zystektomie.....	70
3.4.3.2 Tumorspezifisches Überleben .....	71
3.4.3.3 Gesamtüberleben .....	72
3.5 Multivariate Analysen.....	73
3.5.1 XPA-210.....	73
3.5.2 PTOV1 .....	74
4. Diskussion .....	76
4.1 Patientenkollektiv .....	76
4.2 Kritischer Vergleich der Ergebnisse mit bisherigen Studien .....	77
4.2.1 Kritischer Vergleich von XPA-210 .....	77
4.2.2 Kritischer Vergleich von PTOV1.....	81
4.3 Klinische Bedeutung und möglicher Einsatz der Marker .....	84
4.3.1 Klinische Bedeutung von XPA-210 .....	85
4.3.2 Klinische Bedeutung von PTOV1 .....	86
4.4 Limitierende Faktoren .....	86
4.5 Schlussfolgerungen .....	87
5. Zusammenfassung .....	88
6. Literaturverzeichnis .....	90
Danksagung .....	99
Lebenslauf.....	100
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	102
Veröffentlichungen.....	103

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CSS	cancer-specific survival (tumorabhängiges Überleben)
<i>dest.</i>	<i>destillata</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FDA	Food and Drug Administration (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
HE	Hämatoxylin-Eosin
LK	Lymphknoten
min	Minute
MKI67	monoclonal antibody Ki-67
mm	Millimeter
NMP22	Nukleäres Matrixprotein Nr. 22
OS	overall survival (Gesamtüberleben)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PTOV1	Prostate tumor overexpressed gene 1 protein
RFS	recurrence-free survival (rezidivfreies Überleben)
S-TK1	Serum-Konzentration der Thymidinkinase 1
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TK1	Thymidinkinase 1
TK2	Thymidinkinase 2
TMA	Tissue Microarray
Tp53	Tumor-Protein p53

## Abkürzungsverzeichnis

---

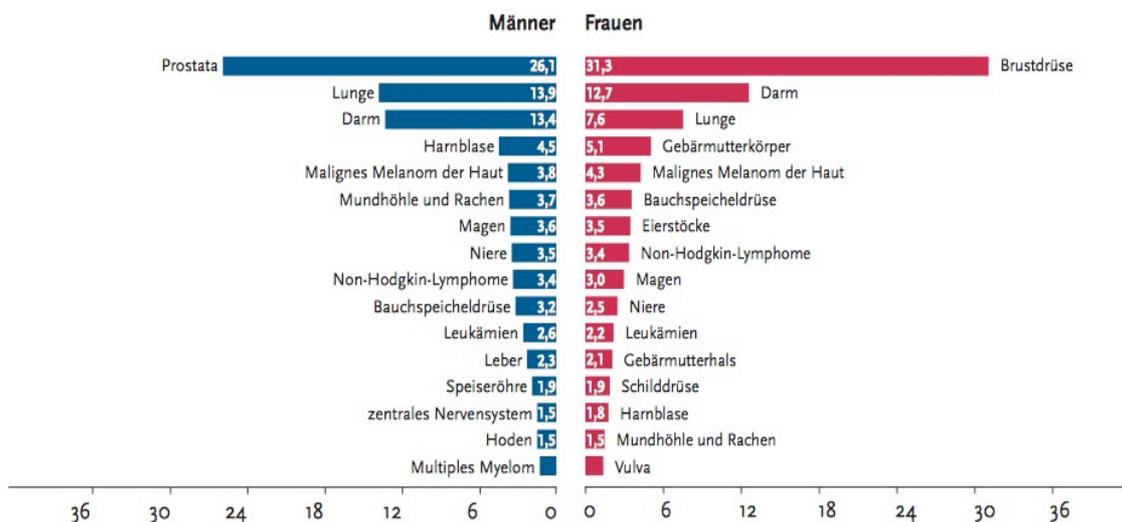
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata
UICC	Union internationale contre le cancer
XPA-210	Exposed proliferation antigen 210 (der Thymidinkinase 1)

# 1. Einleitung

## 1.1 Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist die häufigste Tumorart des Urogenitaltraktes. Laut Schätzung der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch-Institutes aus dem Jahr 2010 ist das Harnblasenkarzinom die vierthäufigste Krebsart beim Mann nach dem Prostatakarzinom, nach Lungen- und Darmkrebs. Bei der Frau steht das Harnblasenkarzinom in der Krebsstatistik auf Position zwölf (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2010 (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

Im Jahr 2008 gab es in Europa 139 500 Neuerkrankungen pro Jahr. Männer waren in 109 700 Fällen betroffen, Frauen in 29 800 Fällen (Ferlay et al., 2010). Dies entspricht einem Verhältnis von 3,7:1. In Deutschland erkrankten im Jahr 2010 11 350 Männer und 4 150 Frauen an einem invasiven Harnblasenkarzinom, was einem Verhältnis von 2,7:1 entspricht (Robert Koch-

Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

Das mittlere Erkrankungsalter ist mit 72 (m) bzw. 74 (w) Jahren verhältnismäßig hoch im Vergleich zu anderen Krebsarten, wobei immer wieder auch jüngere Patienten betroffen sind (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2010). Bedingt durch den demographischen Wandel und die zunehmend älter werdende Bevölkerung wird das Harnblasenkarzinomen jedoch in den kommenden Jahren immer weiter an Bedeutung gewinnen.

### **1.1.2 Pathologie**

Der überwiegende Anteil der Harnblasenkarzinome in der westlichen Welt sind mit ca. 95% Urothelkarzinome (auch als Transitionalzellkarzinome bezeichnet). Plattenepithelkarzinome (2%) und Adenokarzinome (1%) machen hierzulande nur einen kleinen Anteil aus. Leiomyosarkome, Rhabdomyosarkome und Phaeochromozytome sind extrem selten (Metts et al., 2000).

Demgegenüber finden sich in Ostafrika und dem Mittleren Osten vor allem Plattenepithelkarzinome, bedingt durch chronische Entzündungsreaktionen nach Infektion durch den Saugwurm *Schistosoma haematobicum*, dem Erreger der Blasenbilharziose (Mostafa et al., 1999).

### **1.1.3 Klassifikation**

#### **1.1.3.1 TNM**

Die Einteilung des Harnblasenkarzinomes orientiert sich an der TNM-Einteilung der UICC (Union internationale contre le cancer).

Dabei werden neben der Infiltration des Primärtumors (T) die Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) beurteilt. Die aktuelle Einteilung stammt hierbei aus dem Jahr 2002.

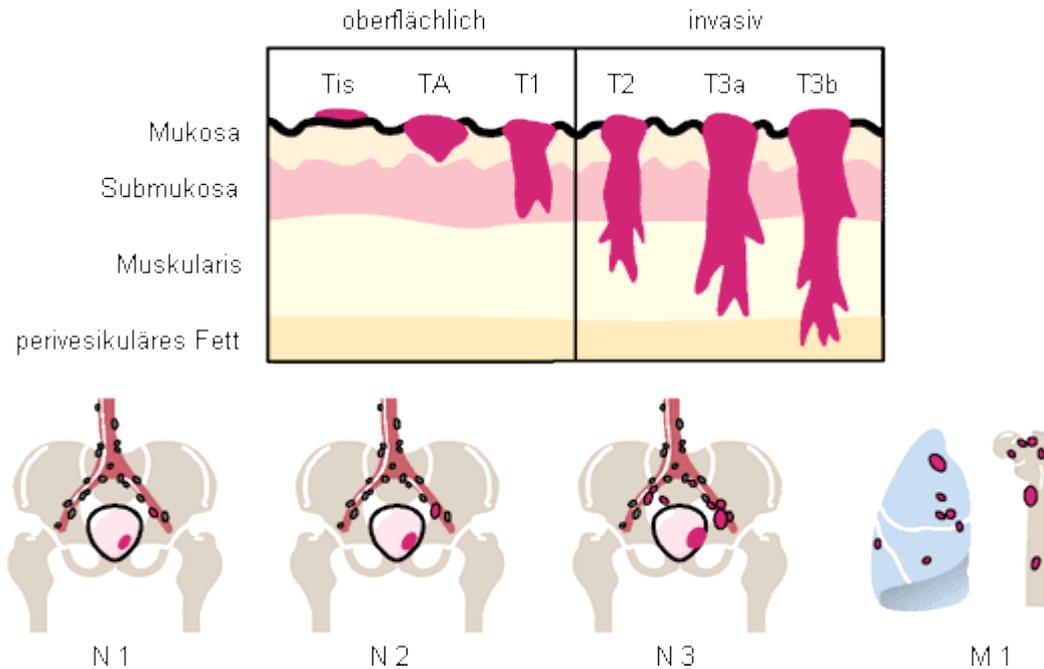
Beim Harnblasenkarzinom werden oberflächliche, nicht-muskelinvasive Karzinome, die sich auf das Urothel und die Lamina propria der Harnblase beschränken (Ta, Tis, T1), von muskelinfiltrierenden (invasiven)

Harnblasenkarzinomen (T2-T4) unterschieden. Dabei werden bei der Erstdiagnose des Blasenkarzinomes 70% - 80% nicht-muskel-invasive Karzinome und ca. 20% - 30% muskel-invasive Karzinome diagnostiziert (Metts et al., 2000).

Diese Arbeit befasst sich alleine mit muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinomen T>1.

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
Ta	Nicht-invasives <i>papilläres</i> Karzinom
Tis	<i>Carcinoma in situ</i> : bei flachen ( <i>nicht-papillären</i> ) Tumoren
T1	Tumor infiltriert die Lamina propria
T2	Tumor infiltriert die Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert nur die oberflächliche Muskulatur (<50%)
T2b	Tumor infiltriert die tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert das perivesikale Fettgewebe
T3a	Nur mikroskopische Infiltration des Fettgewebes
T3b	Makroskopische Infiltration / extravasikale Tumormasse
T4	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina, Becken- oder Abdominalwand
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina
T4b	Tumor infiltriert die Becken- oder Abdominalwand

**Tab. 1:** T-Stadien des Harnblasenkarzinoms



**Abb. 2:** TNM-Stadien des Harnblasenkarzinomes (Roche, 2003)

N - Lymphknotenmetastasen (LK)	
NX	Regionale Lymphknoten nicht untersucht
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in 1 LK, 2 cm im größten Durchmesser
N2	Metastase in 1 LK, >2–5 cm, Metastasen in multiplen LK, keine >5 cm
N3	Metastase(n) >5 cm im größten Durchmesser

**Tab. 2:** N-Stadien des Harnblasenkarzinomes

Lymphknotenmetastasen befinden sich vor allem in den regionalen Lymphknoten der iliakalen, obturatorischen, präsakralen und aortalen Region (Metts et al., 2000).

M – Fernmetastasen	
MX	Präsenz von Fernmetastasen nicht untersucht
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachgewiesen

**Tab. 3:** M-Stadien des Harnblasenkarzinomes

Bei etwa 5-20% der Patienten treten schon bei Erstdiagnose der Erkrankung Fernmetastasen auf (Metts et al., 2000). Häufigster Fern-Metastasierungsort sind Knochen, Leber, Lunge, Peritoneum und Gehirn, wobei die Metastasierungswahrscheinlichkeit ab Stadium pT3b 50% beträgt.

### 1.1.3.2 Grading

Das histologische Grading des Harnblasenkarzinomes erfolgt nach der Einteilung der WHO. Seit 2004 existiert dabei eine neue Einteilung, die besonders in Bezug auf die Risikobewertung hinsichtlich der Progredienz des Tumors einen Vorteil gegenüber dem alten Grading besitzt. Da sich diese Arbeit insbesondere mit Gewebeproben beschäftigt, welche vor der Einführung des neuen WHO-Gradings entnommen wurden, wurde in dieser Arbeit auf das WHO-Grading von 1973 zurückgegriffen.

#### 1973 WHO-Grading

Urothelpapillom	
Grade 1	gut differenziert
Grade 2	mäßig differenziert
Grade 3	schlecht differenziert

**Tab. 4:** WHO-Grading von 1973

#### 2004 WHO-Grading

Urothelpapillom
Papilläres urotheliales Neoplasma mit niedrig malignem Potential (PUNLMP)
Papilläres Urothelkarzinom mit niedrigem Malignitätsgrad (low-grade)
Papilläres Urothelkarzinom mit hohem Malignitätsgrad (high-grade)

**Tab. 5:** WHO-Grading von 2004

Muskelinvasive Harnblasenkarzinome sind in der Regel schlechter differenziert als oberflächliche Karzinome und sind häufig Grade 2 und 3 zuzuordnen.

### 1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die Ursachen für das Auftreten von Harnblasenkarzinomen sind multifaktoriell. Den mit Abstand größten Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom stellt das Rauchen dar. So werden bei den Männern 50-65% und bei den Frauen 20-30% der Harnblasenkarzinome durch Tabakrauch ausgelöst (IARC, France 1986). Verantwortlich für das erhöhte Risiko sind dabei vor allem die in den Zigaretten enthaltenen aromatischen Amine. Die Inzidenz hängt dabei von der Dauer des Rauchens und der Anzahl gerauchter Zigaretten pro Tag ab (Baris et al., 2009, Brennan et al., 2000). Auch Passivrauchen gilt als Risikofaktor.

Mit 20-25% der Fälle die zweithäufigste Ursache ist eine Exposition zu Chemikalien. Insbesondere Benzolderivate sowie Arylamine stellen eine Gefahr dar (Skipper et al., 2003).

Weitere Risikofaktoren wie der Gebrauch von Analgetika oder chronische Infektionen des Urogenitaltraktes werden diskutiert (Abol-Enein, 2008, Bosetti et al., 2012). Letzteres ist allerdings nur für *Schistosoma haematobium* bewiesen (Warren et al., 1995).

Eine erhöhte Blasenkarzinomrate nach vorausgehender Bestrahlung des Urogenitaltraktes konnte nicht nachgewiesen werden (Chrouser et al., 2005).

Auch Ernährungsgewohnheiten spielen eine Rolle. Eine obst- und gemüsereiche Ernährung wirkt dabei protektiv und reduziert das Harnblasenkarzinomrisiko (Steinmaus et al., 2000).

### 1.1.5 Klinik

Leitsymptom beim Harnblasenkarzinom ist eine schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie. Dieses sehr unspezifische Zeichen wird jedoch oftmals verkannt, denn auch Entzündungen der Harnblase führen beispielsweise häufig zu Blutbeimengungen im Urin. Schmerzen im Becken sowie Dysurien, zum Beispiel durch Obstruktion der ableitenden Harnwege bedingt, sind häufig Anzeichen eines schon weiter fortgeschrittenen Tumors.

### **1.1.6 Diagnostik und Staging**

Unspezifische Symptome und eine häufig wenig richtungsweisende körperliche Untersuchung machen eine frühzeitige Diagnose des Harnblasenkarzinoms oft schwierig. Diagnostische Methoden der Wahl sind zunächst bildgebende Verfahren, wie z.B. Ultraschalluntersuchungen des Urogenitaltraktes und computertomographische Untersuchungen, welche auch im weiteren Staging in Bezug auf Tumorausdehnung und etwaigen Lymphknotenbefall eine wichtige Rolle spielen. Ergänzt werden diese durch Untersuchungen des Urins und invasive Untersuchungen der Harnblase.

#### **1.1.6.1 Zystoskopie**

Die Zystoskopie, die Spiegelung der Harnblase, stellt sowohl ein therapeutisches als auch ein diagnostisches Mittel dar. Mit Hilfe eines Endoskopes können unter kontinuierlicher Spülung Schleimhaut und Harnblasenwand inspiziert werden. Zeitgleich kann zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken eine transurethrale Resektion der Harnblase (TUR-B) bzw. der Prostata (TUR-P) vorgenommen werden und somit auffälliges Gewebe abgetragen werden. Die Zystoskopie ist jedoch ein invasives und somit für den Patienten unkomfortables Verfahren und weist nur eine Sensitivität von ca. 90% auf (Tetu, 2009). Insbesondere sehr frühe Tumorstadien oder das *carcinoma in situ* (CIS) werden häufig übersehen (Tritschler et al., 2013).

#### **1.1.6.2 Urinzytologie**

Als nicht invasive Untersuchung steht der Zystoskopie die Urinzytologie gegenüber. Die zellulären Bestandteile des Urins werden hierbei mikroskopisch untersucht und Änderungen in Zellzahl, Morphologie und Zusammensetzung beurteilt.

Die Ergebnisse sind dabei stark abhängig von der Probenqualität und weisen eine hohe Interobserver-Variabilität auf (Sanchez-Carbayo, 2003). Die zytologische Untersuchung des Urins hat bei erfahrenen Untersuchern eine sehr hohe Spezifität von 95-100%, die Sensitivität ist jedoch, insbesondere bei low-grade Tumoren, stark limitiert (Bastacky et al., 1999).

### **1.1.6.3 Molekulare Harnblasenkarzinom-Marker**

Der Gebrauch von molekularen Markern soll helfen, die diagnostische Lücke zwischen klinischer Beobachtung und oben genannten Methoden zu schließen. Der ideale Tumormarker sollte dabei eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen, einfach bei der breiten Masse der Bevölkerung anzuwenden sein und eine kostengünstige Analyse ermöglichen (Lokeshwar et al., 2005).

Derzeit gibt es keinen singulären Marker, der der Diagnostik des Harnblasenkarzinomes dient oder im Idealfall sogar den weiteren Verlauf der Tumorerkrankung oder das Auftreten von Metastasen prognostizieren könnte (Gakis et al., 2012). Molekulare Marker sind jedoch ein aktuell viel erforschtes Thema. Dabei konzentriert man sich auf verschiedene molekulare Pathomechanismen, welche im Tumor verändert sind. Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang Mikrosatelliten, (Proto-)Onkogene, Tumorsuppressorgene, Zellzyklusregulatoren, (Anti-)Angiogenesefaktoren und extrazelluläre Matrix-Adhäsionsmoleküle (Habuchi et al., 2005).

Eine routinemäßige Anwendung dieser Verfahren ist jedoch sehr teuer (Halling, 2003, Tritschler et al., 2013). Ein weiterer Nachteil ist außerdem ein hoher Anteil an falsch positiven Ergebnissen zum Beispiel bedingt durch Infektionen des Urogenitaltraktes, durch eine Hämaturie oder eine Niereninsuffizienz (Todenhofer et al., 2013).

Die weitere Erforschung dieser Mechanismen ist dringend notwendig, um in Zukunft die Diagnostik primärer und sekundärer Harnblasenkarzinome zu erleichtern, frühere Therapiemöglichkeiten zu ermöglichen und letztendlich die Prognose des Harnblasenkarzinoms zu verbessern.

### **1.1.7 Therapie**

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms richtet sich nach dem Alter und der Risikokonstellation des Patienten, dem Tumorstadium sowie dem histologischen Grading. Dabei beruht die Therapie vor allem auf zwei verschiedenen Säulen, der operativen Therapie und der Chemotherapie. Die Chemotherapie kann dabei je nach Stadium adjuvant oder neoadjuvant verabreicht werden und kann lokal als Installationstherapie sowie systemisch

gegeben werden (Witjes et al., 2014). Als Installationstherapie werden chemotherapeutisch vorwiegend Mitomycin sowie immuntherapeutisch die abgeschwächten Tuberkelbakterien BCG verabreicht (Shelley et al., 2003). Systemisch wird vorwiegend bei inoperablen und metastasierten Karzinomen behandelt, wobei verschiedene Chemotherapieschemata angewandt werden können. Nach aktueller First-Line-Therapie wird die Kombination aus Gemcitabin mit Cisplatin oder das MVAC-Schema, bestehend aus Methotrexat (M), Vinblastin (V), Adriamycin (A) (=Doxorubicin) und Cisplatin (C), empfohlen (Stenzl et al., 2011).

Die operative Therapie umfasst einerseits endoskopische Verfahren wie die transurethrale Resektion der Harnblase bei Krebsvorstufen oder oberflächlichen Karzinomen, andererseits offene Operationen bis hin zur radikalen Zystektomie bei fortgeschrittenen Stadien und muskelinfiltrierenden Karzinomen.

Eine zusätzliche Bestrahlung kann präoperativ die Tumormasse verringern, eine erhöhte Überlebensrate ist jedoch nicht bewiesen (Cole et al., 1995, Widmark et al., 2003).

Die radikale Zystektomie ist bei beiden Geschlechtern die Standardtherapie des muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinoms (Stein und Skinner, 2006). Dabei wird die gesamte Harnblase mit allen sichtbaren und resezierbaren Tumoranteilen entfernt. Des Weiteren beinhaltet die Operation eine Entfernung der distalen Ureteren sowie eine Ausräumung der lokalen Lymphknoten. Bei der Frau wird eine vordere Exenteration durchgeführt, welche, neben der Entfernung von Harnblase, distalen Ureteren und Lymphknoten, außerdem die Entfernung der gesamten *Urethra*, der anhängenden *Vagina* und des *Uterus* beinhaltet. Abweichungen vom Standardverfahren sind je nach Tumorlokalisierung, -ausbreitung und Infiltrationstiefe möglich. Beim Mann erfolgt die Operation in der Regel als Zystoprostektomie mit zeitgleicher Entfernung der Prostata sowie eventuell der Samenblasen (Stenzl et al., 2011). Operationsrisiken und Folgen wie Inkontinenz und Impotenz, die zu einer sinkenden Lebensqualität führen können, sowie Überlebensvorteile müssen dabei gegeneinander aufgewogen werden, um anschließend individuell zu entscheiden (Miller et al., 2003).

Zur anschließenden Urinableitung nach Zystektomie stehen drei verschiedene Methoden zur Verfügung: die abdominale, urethrale und rectosigmoidale Ableitung. Bevorzugte Methode ist die Bildung einer Neoblase als Urinreservoir, welches eine kontinente Form der Urinableitung darstellt (Hautmann et al., 2006).

### 1.1.8 Prognose

In der Sterbestatistik des Robert Koch-Institutes liegt das Harnblasenkarzinom bei Männern auf Platz 10, bei Frauen auf Platz 12 (e.V., 2006). Verglichen mit der Inzidenz gehört es somit insgesamt gesehen zu den weniger aggressiven Krebsarten. Diese Statistik bezieht sich jedoch auf alle bösartigen Neubildungen der Harnblase, z.B. auch *in situ* Neubildungen, die eine deutlich bessere Prognose haben und lässt sich so nicht auf das muskelinvasive Harnblasenkarzinom übertragen, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt.

Sowohl beim oberflächlichen als auch beim muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinom sind individuell sehr unterschiedliche Verläufe zu beobachten. Während ein Teil der Patienten durch die radikale Zystektomie als geheilt angesehen werden kann, kommt es bei einem anderen Teil der Patienten zu einem Rezidiv. Dabei reicht die Zeitspanne, in der das Rezidiv auftritt, von wenigen Wochen/Monaten bis hin zu vielen Jahren nach Therapieende. Auch hinsichtlich des Gesamtüberlebens wie auch des tumorspezifischen Überlebens werden große Variabilitäten beobachtet (Stein et al., 2001). Nach Zystektomie beträgt die 5-Jahres-Heilungsrate (recurrence-free survival rate) 66% - 68% bei Männern bzw. 58% - 66% bei Frauen (Gschwend et al., 2002).

Bisher wird als prognosebestimmender Faktor vor allem auf die TNM-Klassifikation der UICC zurückgegriffen. Die Prognose des Harnblasenkarzinoms ist dabei insbesondere von der Infiltrationstiefe sowie dem Lymphknotenstatus abhängig (Bassi et al., 1999). Metastasenbildung ist zudem häufig mit schnell wachsenden Tumoren assoziiert und hat mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von weniger als 5% eine extrem schlechte Prognose (Metts et al., 2000). Wenige molekulare Marker sind als

prognostisch signifikant beschrieben, eine routinemäßige Anwendung erfolgt jedoch bislang noch nicht (Lotan et al., 2013, Sanguedolce et al., 2014).

Die Erforschung weiterer individueller prädiktiver Faktoren ist demzufolge dringend notwendig, um sich auf unterschiedliche Krankheitsverläufe einzustellen, Therapie und Nachsorgeregimes individuell anzupassen und somit letztendlich die Prognose des Harnblasenkarzinomes zu verbessern.

## **1.2 Marker**

### **1.2.1 Thymidinkinase 1 / XPA-210**

#### **1.2.1.1 Das Enzym**

Die Thymidinkinase 1 (TK1) ist ein wichtiges Enzym des DNA-Stoffwechsels und beteiligt am *Salvage-Pathway* der Nukleinsäuren. Dem gegenüber steht die von der Thymidylat-Synthase katalysierte DNA-*de-novo*-Synthese.

Die TK1 katalysiert in einer substratspezifischen Reaktion die Umwandlung des Nucleosids Desoxythymidin (trivial:Thymidin) zum Nucleotid Desoxythymidinphosphat durch Übertragung einer  $\gamma$ -Phosphatgruppe eines Nucleosidtriphosphates (zu 70-85% ATP) auf die 5'-Hydroxylgruppe des Thymidins, welches anschließend in die DNA eingebaut werden kann (Eriksson et al., 2002, Hannigan et al., 1993).

Es existieren zwei Isoenzyme der Thymidinkinase, die zellzyklusabhängige, zytoplasmatische TK1 und die zellzyklusunabhängige, mitochondriale TK2 (Hannigan et al., 1993). Erstere ist auf den Genen der Chromosomen 17q23.2-q25.3 (Elsevier et al., 1974, Petty et al., 1996) und 16q22-q23.1 (Willecke et al., 1977) lokalisiert.

Die zellzyklusabhängige TK1 wird in der Synthese-Phase des Zellzyklus, der Phase der DNA-Replikation, stark exprimiert. Dabei erhöht sich die Enzymaktivität im G1-S-Phase-Übergang um das 10-fache. In der anschließenden Mitosephase sinkt die Enzymaktivität wieder rasant (Larsson, 2007, Sherley und Kelly, 1988). Mit verantwortlich für den Funktionsverlust in der Mitosephase ist die in der C-terminalen Region lokalisierte sogenannte KEN-Sequenz, Teil eines Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweges (Ke und Chang, 2004). In der G0-Phase, einer Phase, in der keine Zellteilung stattfindet, kann keine Enzymaktivität nachgewiesen werden (Sherley und Kelly, 1988). Somit ist die Enzymkonzentration der TK1 ein Maß für die Proliferationsfähigkeit einer Zelle und kann in Form der Serumkonzentration (S-TK1) oder in Form der Stärke der Gewebeexpression als Tumormarker verwendet werden.

Die Aktivität der TK2 konnte nur in ruhenden Zellen gezeigt werden und beträgt nur einen Bruchteil der Aktivität der TK1 (Eriksson et al., 2002).

XPA-210, das exposed proliferation antigen, angeordnet um die Aminosäure 210 ist ein spezifisches Epitop und wichtiges Key-Peptid der TK1 (Larsson, 2007). Lokalisiert ist dieses in der C-terminalen Region der Kinase (He et al., 1996). Antikörper, die selektiv gegen dieses Epitop gerichtet sind, ermöglichen eine spezifischere Bindung und geringere Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen (Aufderklamm et al., 2011). Somit bietet XPA-210 insbesondere bei Nutzung in immunhistologischen Untersuchungen Vorteile gegenüber der TK1.

### **1.2.1.2 Studienlage**

Die Funktion der TK1 als Proliferationsmarker konnte zunächst vor allem für Erkrankungen des blutbildenden Systems, erstmals 1984 für das Non-Hodgkin-Lymphom (Gronowitz et al., 1983), insbesondere aber auch für akute und chronische Leukämien, sowie das multiple Myelom nachgewiesen werden (Hallek et al., 1988, Poley et al., 1997). Weitere Erfolge zeigten sich anschließend als Proliferationsmarker bei Karzinomen des Ovars (Look et al., 1997), bei Brustkrebs (He et al., 2004), Karzinomen der Lunge (Gronowitz et al., 1986, Mao et al., 2005), colorektalen Karzinomen (Svobodova et al., 2007) sowie Karzinomen des Magens (Kemik et al., 2011).

Dabei wurde in einigen Studien die Aktivität der Thymidinkinase 1 im Gewebe, in anderen im Serum (als S-TK1-Konzentration) gemessen. Die TK1-Konzentration im Serum wird als sensitiver als die Aktivität der Thymidinkinase im Gewebe beschrieben (He et al., 2005).

In verschiedenen Studien konnte die Wertigkeit des Markers außerdem in Zusammenhang mit urogenitalen Karzinomen gezeigt werden.

So zeigten Gakis et al. im November 2010 sowie Kruck et al. in einer Folgestudie 2011 die Funktion von XPA-210 als Proliferationsmarker beim klarzelligen Nierenzellkarzinom. Im Tumorgewebe fand sich dabei eine erhöhte Färbeintensität und –dichte im Vergleich zum Normalgewebe, ein signifikanter

Zusammenhang konnte zu Tumorstage und -grading hergestellt werden (Gakis et al., 2011, Kruck et al., 2011).

Ähnliche Zusammenhänge konnten von Aufderklamm et al. im Jahr 2011 für das Prostatakarzinom nachgewiesen werden. Im Follow-up wurde zudem der Nutzen von XPA-210 als prädiktivem Marker gezeigt (Aufderklamm et al., 2011).

Für das Harnblasenkarzinom stehen nur wenige Studien zur Verfügung.

Mizutani et al. untersuchten im Jahre 2002 die TK1-Expression im Gewebe, Zhang et al. im Jahr 2005 die Konzentration im Serum. Auch hier konnte ein Zusammenhang der TK1-Aktivität zu Tumorstage und -grading hergestellt werden. Zudem zeigten sich erste Hinweise auch hinsichtlich des prognostischen Nutzens (Mizutani et al., 2002, Zhang et al., 2006).

Zur XPA-210-Konzentration im Gewebe des Harnblasenkarzinomes liegen bislang keine Daten vor.

## **1.2.2 PTOV1**

### **1.2.2.1 Das Protein**

PTOV1, Akronym für prostate tumor overexpressed, ist ein Gen und Protein, welches im Jahr 2001 ursprünglich in Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom entdeckt wurde und in dessen Tumorgewebe vermehrt exprimiert wird (Benedict et al., 2001).

Das 12-Exon-PTOV1-Gen ist im menschlichen Chromosom 19q13.3-13.4 lokalisiert und exprimiert das PTOV1-Protein, welches aus zwei nahezu identischen homologen Blöcken von 151 bzw. 147 Aminosäuren besteht und durch ein kurzes Zwischenpeptid verbunden ist (Benedict et al., 2001).

PTOV-1 ist ein zellzyklusabhängiges Protein, welches sich zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her bewegt. Steigende Konzentrationen im Zellkern zeigen sich zu Beginn der S-Phase und erreichen ihren Höhepunkt in der M-Phase. PTOV-1 induziert dabei den Übergang der Zelle in die S-Phase und zwingt die Zelle somit in ein Proliferationsstadium (Santamaria et al., 2003). Dies zeigt den Nutzen von PTOV-1 als Zellproliferationsmarker.

### **1.2.2.2 Vergleich mit Ki-67**

Ein bereits bekannter und umfassend charakterisierter Marker proliferierender Zellen und somit einen guten Vergleichsmarker zu PTOV1 stellt Ki-67 dar. Dieses labile nukleäre Protein ist eng mit dem Zellzyklus verknüpft. In der Mitte der G1-Phase steigt die Konzentration des Proteins langsam an, hat hohe Konzentrationen in der S-Phase und G2-Phase und erreicht seinen Höhepunkt zum Ende der Mitosephase. In ruhenden Zellen (G0-Phase) wird es nicht exprimiert (Gerdes et al., 1984, Tan et al., 2005, Verheijen et al., 1989).

Hohe Korrelationen zwischen Ki-67 und PTOV-1 konnten unter anderem beim Prostata-Karzinom belegt werden (Santamaria et al., 2003). Bei gleichzeitiger Färbung mittels Ki-67 und PTOV1 konnte die Relevanz der nukleären Fraktion des PTOV1 nachgewiesen werden. Während sich die Zellen in der G0-Phase befanden, nachgewiesen durch fehlende Anfärbbarkeit von Ki-67, fand sich PTOV1 mehrheitlich im Zytoplasma. Sobald Ki-67 nachgewiesen werden konnte und die Zelle somit in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten sein musste, fand sich PTOV1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. 24 Stunden nach Proliferation und somit in der ruhenden Zelle fand sich PTOV1 dann wieder überwiegend im Zytoplasma. Somit lassen sich vor allem mit der nukleären Fraktion des PTOV1 Aussagen über den Proliferationsstatus eines Gewebes treffen.

Eine Korrelation zwischen PTOV1 und Ki-67 konnte auch für das Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich war die Assoziation zwischen hohen Ki-67-Konzentrationen und einem hohen Grading des Tumors beim bereits bekannten Marker Ki-67 allerdings höher als bei PTOV1 (Fernandez et al., 2011).

### **1.2.2.3 Studienlage**

In der Ursprungsstudie aus dem Jahr 2001 konnte die vermehrte Expression von PTOV1 im Tumorgewebe des Prostatakarzinoms sowie bei der Prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) im Vergleich zum untersuchten Normalgewebe sowie der benignen Prostatahyperplasie gezeigt werden. Eine Korrelation zwischen Tumorstage und -grading und erhöhten PTOV1-

Konzentrationen konnte zunächst nicht nachgewiesen werden (Benedict et al., 2001).

PTOV1 ist außerdem signifikant erhöht bei der atypischen adenomatösen Hyperplasie sowie bei der High-Grade-PIN. Die Expression nimmt hierbei von Krebsvorstufen hin zum Karzinom zu. High-Grade-PIN aus radikalen Prostektomiepräparaten zeigen eine erhöhte Expression im Vergleich zu solchen aus Zystoprostektomiepräparaten, näher am Karzinom gelegene PIN eine erhöhte Expression im Vergleich zu eher randständig gelegenen. PTOV1 kann insbesondere bei Fällen einer PIN nachgewiesen werden, bei denen später auch ein Karzinom nachgewiesen werden konnte. Somit dient PTOV1 auch als prognostischer Marker und kann zur frühen Diagnose des Prostatakarzinoms beitragen (Mazzucchelli et al., 2011, Mazzucchelli et al., 2013, Morote et al., 2008).

Fernandez et al. demonstrierten im Jahr 2010 mittels der Tissue Microarray-Technik das Potential dieses Proteins als Tumormarker auch über das Prostatakarzinom hinaus (Fernandez et al., 2011). Bei der Untersuchung von 12 verschiedenen Tumorgeweben (Harnblase, Brust, ZNS, Colon, Endometrium, Niere, Leber, Lunge, Ovar, Pankreas, Haut und Magen) konnte in mehr als 95% der Fälle eine PTOV1-Überexpression festgestellt werden. Eine hohe Expression fand sich besonders signifikant in hochgradigen Tumoren, insbesondere beim Harnblasenkarzinom. Allerdings wurde in dieser Studie mit nur 11 Harnblasenkarzinom-Präparaten eine sehr geringe Fallzahl untersucht. Zwar konnte bei Einschluss von 5 Low-Grade - (G1, G2) und 6 High-Grade (G3, G4) - Tumoren eine Assoziation zwischen Enzymkonzentration und Grading nachgewiesen werden, nach Tumorstage/TNM-Stadien wurde jedoch nicht unterschieden. Weitere Studien zum Harnblasenkarzinom liegen nicht vor, die Datenlage zu PTOV1 beim Harnblasenkarzinom ist somit sehr spärlich.

Zuletzt konnte der Nutzen von PTOV1 als Proliferationsmarker in verschiedenen Studien für gleich drei unterschiedliche Tumorarten nachgewiesen werden. Sowohl beim Ovarialkarzinom (Guo et al., 2015), als auch bei Brustkrebs (Lei et al., 2014) und dem hepatozellulären Karzinom (Chen et al., 2015) zeigten sich dabei Zusammenhänge zu histopathologischen

Komponenten. In allen Studien konnten zudem signifikante Einflüsse auf die Überlebensraten nachgewiesen werden, was erneut den Nutzen von PTOV1 als prognostischen Marker bekräftigt.

### **1.3 Fragestellung / Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst anhand eines umfassend charakterisierten Kollektives von Patienten mit muskelinfiltrierendem Harnblasenkarzinom mittels der Tissue Microarray-Technik die Proteinexpression von XPA-210 und PTOV1 sowohl in Tumorgeweben als auch in korrespondierenden normalen Urothelien quantitativ zu bestimmen. Die geplanten Proteinbestimmungen im Tumorgewebe sollten so zur Aufklärung der Tumorbiologie des Blasenkarzinoms beitragen. Durch Vergleich mit Normalgewebe sollte die molekulare Ebene des Harnblasenkarzinoms besser verstanden werden.

Im Anschluss daran wurde die potentielle diagnostische und prognostische Wertigkeit der beiden Marker und somit deren Signifikanz in der klinischen Onkologie untersucht.

Das Harnblasenkarzinom ist der häufigste Tumor des Urogenitaltraktes. Gerade das muskelinfiltrierende Harnblasenkarzinom weist eine noch immer nicht zufriedenstellende Prognose auf. Bei Entdeckung ist dieses häufig schon metastasiert mit weitreichenden Konsequenzen in Bezug auf Lebenserwartung und Lebensqualität. Umso wichtiger sind beispielsweise Möglichkeiten zur frühen Identifizierung von Hochrisikopatienten mit Tendenz zu einer schnellen Progression, frühzeitigen Metastasierung und somit insgesamt geringeren Überlebenszeit. Die Darstellung einer individuellen Tumorbiologie kann zur Entwicklung von modernen und individuellen Therapieregimes beitragen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Ethik**

Vor Aufnahme der experimentellen Arbeit wurde ein Prüfplan für wissenschaftliche Untersuchungen erstellt. Dieser enthielt den Titel und Inhalt der Arbeit, Namen beteiligter Ärzte und Wissenschaftler sowie Angaben über die Finanzierung. Das Ziel der geplanten Studie, die Studiendauer und die Studienpopulation wurden definiert, der aktuelle Stand der Wissenschaft als Grundlage erörtert und der geplante Studienablauf sowie geplante Untersuchungsmethoden beschrieben.

Der Prüfplan wurde der Tübinger Ethikkommission vorgelegt, er erhielt das Ethik-Votum 279/2013BO2.

### **2.2 Datenschutz**

Der Umgang mit Patientendaten erfolgte unter Berücksichtigung des Datenschutzgesetzes sowie der ärztlichen Schweigepflicht.

Die Daten wurden nach Abschluss der Erhebungsphase der klinischen Daten anonymisiert, sodass keine Rückverfolgung der entsprechenden Ergebnisse zu einzelnen Patienten und keine Rückführung der Daten möglich ist. Dabei wurden den Patienten fortlaufende Patientennummern zugeteilt, während Name und Geburtsdatum aus der Datenbank entfernt wurden.

Der für die Datenbearbeitung benutzte Rechner wurde ausschließlich von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Urologie benutzt, war vom internen Kliniknetz abgekoppelt und besaß keinen Internetanschluss.

## **2.3 Studienkollektiv**

### **2.3.1 Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Zystektomie**

Auf Grundlage von bereits bestehenden Datenbanken wurde eine Gesamt-Datenbank mit allen Harnblasenkarzinom-Patienten des Universitätsklinikums Tübingen, die sich zwischen 12/1984 und 12/2006 an der Klinik für Urologie einer Zystektomie unterzogen haben, erstellt. Diese wurde anschließend durch weitere Parameter aus Pathologieberichten, Arztbriefen und Berichten über eine durchgeführte Bildgebung ergänzt. Die finale Datenbank umfasste schließlich die nachfolgend angeführten Parameter:

Name, Vorname, Geburtsdatum, Geschlecht, OP-Datum, T, N, M, R, G, CIS, vorherige Installationstherapie, neoadjuvante Chemotherapie, adjuvante Chemotherapie, Daten zum klinischen Verlauf nach der Operation wie Rezidivdatum, tumorabhängiges Versterben und letzte Beobachtung ohne Rezidiv sowie individuelle Stammdaten wie Name/Adresse und die behandelnde niedergelassene urologische Praxis.

Ziel war hierbei eine optimale onkologische Charakterisierung des Kollektives zum Zeitpunkt der Zystektomie.

Aus dem Kollektiv ausgeschlossen wurden im Folgenden alle Patienten, bei denen der Zystektomiezeitpunkt vor 01/1996 lag, da die Paraffinblöcke mit dem fixierten Tumorgewebe für diese Patienten nicht mehr existierten. Weiterhin ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen im Zystektomiepräparat kein muskelinfiltrierendes Harnblasenkarzinom bzw. keine urothelialen Karzinomanteile nachweisbar waren. Somit konnte anschließend bei allen in dieser Studie eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Zystektomie ein urotheliales Harnblasenkarzinom  $\geq$ pT2a beobachtet werden.

Dabei entstand ein konsekutives Kollektiv von 1/1996-12/2006 von 111 Patienten mit stattgehabter Zystektomie.

### **2.3.2 Erhebung des postoperativen Follow-up**

Zusätzlich wurde ein postoperatives Follow-up hinsichtlich des weiteren Krankheitsverlaufes erhoben. Dabei wurde zunächst versucht, den Verlauf der Patienten aus Arztbriefen der weiteren Behandlung in der Universitätsklinik Tübingen nachzuvollziehen. Einbezogen wurden außerdem Daten des Comprehensive Cancer Center, welche Informationen bezüglich des letzten Arztbesuches sowie teilweise das Datum des Todes einiger Patienten enthielten. Fehlende Informationen wurden dann durch die Befragung von Patienten, Hausärzten und Urologen vervollständigt. Hausärzte und Urologen wurden dabei per Fax bezüglich dreier Parameter befragt, dem Zeitpunkt des eventuellen Wiederauftretens der Erkrankung / des Rezidives, dem tumorspezifisches Überleben (cancer-specific survival, CSS) und dem Gesamtüberleben (overall survival, OS). Bei weiterhin fehlenden Informationen wurden unter Einverständnis der Patienten Telefongespräche mit diesen geführt, welche ausführlich dokumentiert wurden.

Aus oben genannten Daten konnten anschließend die Time-to-Events in Monaten zwischen OP-Datum und Auftreten des Rezidives, des tumorspezifischen und des allgemeinen Überlebens berechnet werden.

Data-Close-Up, also der letzte Stichtag der Erhebung und somit der Zeitpunkt, der letztendlich die Überlebenden und rezidivfreien Patienten bis zu diesem Datum einschließt, war der 02.08.2013.

### **2.4 Paraffingewebe**

Nach einer Einweisung in das Paraffinarchiv des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen erfolgte das Heraussuchen der benötigten Paraffinblöcke. Die Auswahl der passenden Paraffinblöcke erfolgte anhand der jeweiligen Pathologieberichte. Falls möglich wurden je Patient zwei Blöcke mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinomgewebe sowie ein Normalgewebestück gesucht.

Bei Patienten, in denen bei der radikalen Zystektomie keine Anteile von Resttumorgewebe mehr nachgewiesen werden konnten, wurde falls vorhanden

auf Material der vorherigen TUR-B zurückgegriffen, insofern dort Anteile eines muskelinvasiven Karzinoms nachgewiesen werden konnten.

Anschließend wurde zu jedem Paraffinblock ein HE-Schnitt herausgesucht bzw. bei Nichtvorhandensein hergestellt. Dieser dient zur Markierung (Circelung) repräsentativer karzinomhaltiger Areale in den Tumorgewebeblöcken bzw. repräsentativem Normalgewebe in den Normalgewebeblöcken und ermöglicht so die Auffindbarkeit im anschließenden Tissue Microarray (TMA).



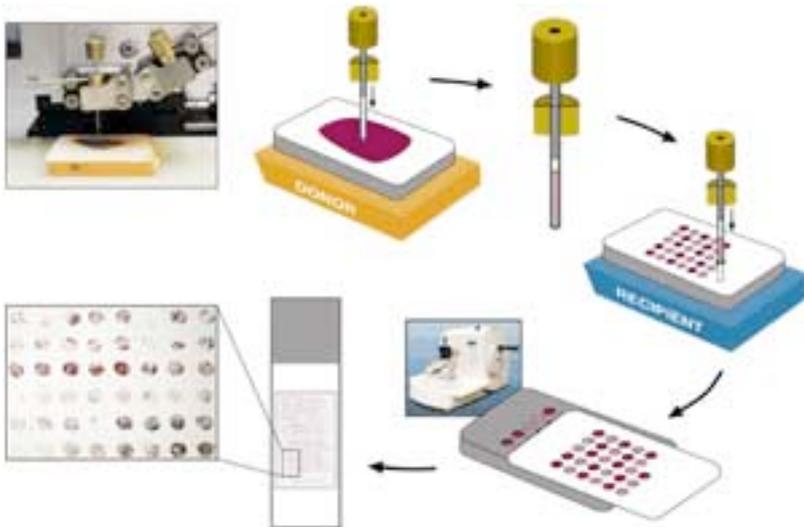
**Abb. 3:** HE-Schnitt mit Filzstiftmarkierung der entsprechenden Areale (Circelung), Tu = Tumorgewebe, N = Normalgewebe.

## **2.5 TMA**

### **2.5.1 Funktionsprinzip**

Der Tissue Microarray, erstmals beschrieben 1998 von Kononen et al. (Kononen et al., 1998), dient der Vervielfältigung von Gewebe zur anschließenden Untersuchung in molekularen und immunhistochemischen Studien.

Hierbei werden mittels eines Stanzzylinders Gewebestanzproben unterschiedlicher Herkunft (Donor) entnommen und in Paraffin (Recipient) eingebettet.



**Abb. 4:** Funktionsprinzip des Tissue Microarrays: gelber Paraffinblock = Donor, blauer Paraffinblock = Recipient, anschließend Anfertigung eines Paraffinschnittes (Giltmane und Rimm, 2004).

Die Größe des Stanzzyinders beträgt hierbei zwischen 0,6 und 3mm. Aus einem Gewebe können dabei bis zu 1000 Proben entnommen und in einen Paraffinblock gebettet werden, was anschließend die gleichzeitige Untersuchung zahlreicher Proben dieses Gewebes ermöglicht. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass anschließende Untersuchungen zeitgleich bei gleichen Umgebungseigenschaften, zum Beispiel gleicher Raumtemperatur sowie gleicher Inkubationszeit und gleichen Färbebedingungen vorgenommen werden können, was eine genaue Vergleichbarkeit dieser Proben ermöglicht. Der TMA ist hierbei eine kostengünstige und außerdem sehr schnell durchzuführende Methode mit geringem Materialverbrauch. Aus einem Paraffinblock können 10-20 Proben entnommen werden, ohne das Gewebe zu beschädigen, auch geringste Tumormengen können so konserviert werden (BeecherInstruments, 1998).

Es wird jedoch eine präzise Platzierung des Stanzzyinders benötigt, um eine repräsentative Gewebeprobe zu erhalten und somit eine genaue Charakterisierung durchführen zu können.

Besondere Anwendung findet der TMA in der Tumorforschung. Zahlreiche Proben eines Tumors können zur prognostischen und diagnostischen

Forschung zeitgleich charakterisiert werden. Häufige Tumorarten sind hierbei zum Beispiel Brust-, Lungen-, Darm-, Prostata-, Pankreas-, Nieren- und Leber-Karzinome.

TMAAs dienen als Grundlage für anschließende Charakterisierungen mittels In-Situ Hybridisierungen der DNA (wie z.B. FISH), RNA (RNA-ISH), in situ-PCR und in situ RT-PCR, aber vor allem von Proteinen mittels Immunhistochemie.

In der onkologischen Forschung dient der TMA somit vor allem dem Verständnis von Signaltransduktionswegen. So können anschließend chromosomale Regionen / multiple Gene nachgewiesen werden, welche durch Rearrangement und Amplifikation zur Dysregulation von kritischen Signaltransduktionswegen für Zellwachstum, -tod und – differenzierung führen.

### **2.5.2. Durchführung**

In dieser Arbeit wurde der Manual Tissue Arrayer MTA-1 der Firma BeecherInstruments, Inc. (Sun Prairie, WI, USA) verwendet.

Aus den Paraffinblöcken mit fixiertem Tumor- und Normalgewebe wurden gemäß Circelung auf dem HE-Schnitt repräsentative Gewebestanden entnommen und in insgesamt vier Empfänger-Paraffinblöcke umgesetzt. Somit wurden schließlich vier Arrays mit insgesamt 363 Dots erstellt. Dabei wurde in Array 1 und 2 eine Stanzdicke von 0,6mm und Array 3 und 4 eine Stanzdicke von 1mm verwendet und ein Abstand von jeweils 1mm zwischen den Dots gewählt. Die mögliche Länge der in den Empfänger-Blöcken eingebrachten Stanzen wurde maximal genutzt, indem mehrere (direkt benachbarte) Gewebeanteile übereinander gestapelt wurden, um den Dot zu füllen. Dies ermöglichte anschließend eine hohe Anzahl an Schnitten des Gewebes und somit viel Gewebe für weiterführende Untersuchungen.

Es wurden von jedem Patienten zwei Tumorgewebestanden und falls vorhanden zwei Normalgewebestanden entnommen. Die Stanzen wurden dabei möglichst aus zwei verschiedenen Blöcken entnommen, um verschiedene Anteile des Tumors zu erreichen. Gab es nur einen Gewebeblock, wurden möglichst weit auseinanderliegende Areale gewählt.

Zur besseren Orientierung innerhalb des Arrays wurde in unregelmäßigen Abständen Schweinemuskulatur als Landmarken-Dots in den Empfängerblock eingefügt.

Um die Gewebestanden und das umliegende Paraffinmaterial anzugleichen, erfolgte anschließend ein Erwärmen auf 37°C im Wärmeschrank.

Mit Hilfe eines Mikrotoms (RM 2125RT, Leica, Nussloch, Germany) wurden Schnitte von 4-6 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

## **2.6 Immunhistochemie**

### **2.6.1 Funktionsprinzip**

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, welches der Charakterisierung von Proteinen dient. Es beruht dabei auf der Anfärbung von Antikörpern, die sich an Proteinstrukturen binden und diese somit sichtbar machen.

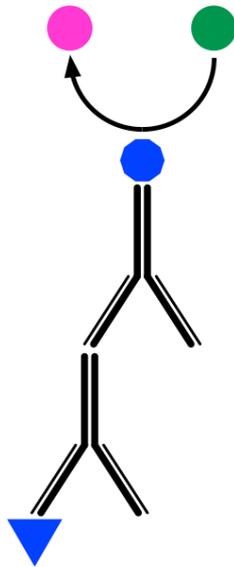
Erstmals beschrieben wurde das Verfahren 1941 von Coons et al. (Coons, 1941) und von diesen in den folgenden Jahren auch weiterentwickelt (Coons, 1971, Coons und Kaplan, 1950).

In der Immunhistochemie stehen ein direktes und ein indirektes Verfahren zur Verfügung.

Bei der direkten Methode werden einem Gewebe Antikörper zugesetzt, welche anschließend in einer Antigen-Antikörper-Reaktion über ein entsprechendes Epitop an im Gewebe vorhandenes Antigen binden. Der Antikörper ist dabei mit einem Enzym, z.B. Fluoreszin, verbunden, welches bei Bindung ein Substrat in Farbe umsetzt. Somit markiert der Antikörper das homologe Antigen, welches anschließend sichtbar wird.

Das Prinzip der indirekten Methode funktioniert ähnlich wie die direkte Methode. Zur Signalverstärkung wird allerdings ein Primärantikörper hinzugefügt, welcher an das Antigenepitop bindet. Erst an diesen bindet der mit einem Enzym verbundene Sekundärantikörper.

Durch Signalverstärkung erlaubt diese Methode auch das Untersuchen von Geweben mit wenigen Epitopen, allerdings wird das Färbeargebnis durch Hintergrundreaktionen unspezifischer.



**Abb. 5:** Indirekte Methode der Immunhistochemie (eigene Darstellung)  
Blaues Dreieck = Antigen, Primär- und Sekundärantikörper, blauer Punkt = Enzym, grüner Punkt = Substrat, rosa Punkt = Farbstoff.

Diese Hintergrundreaktionen werden zum Beispiel auch durch verschiedene Enzyme hervorgerufen, welche ebenfalls im Gewebe aktiv sind. Ein häufiges Beispiel ist die Aktivität der endogenen Peroxidase. Vor Färbung mit dem Antikörper kann die Aktivität dieses Enzyms mit Wasserstoff-Peroxid blockiert werden, wodurch unspezifische Färbereaktionen verringert werden können.

Ziel der Immunhistochemie ist einerseits die Darstellung von Vorkommen und Ort eines Antigens aber auch die Quantifizierung der Antigenmenge mittels optischer Dichte und Färbintensität (Grube, 2004).

In der onkologischen Forschung lassen sich so Tumorzellen identifizieren, welche spezifische Antigene exprimieren und anschließend hinsichtlich Vorkommen, Verteilung und Quantität weiter charakterisieren.

Verwendet wird hierzu ausschließlich fixiertes Gewebe, in dieser Arbeit in Paraffinblöcken fixiertes Zystektomiegewebe. Ausschließlich paraffingängige Antikörper ermöglichen immunhistochemische Untersuchungen am Paraffinpräparat.

## **2.6.2 Immunhistochemische Färbungen**

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten im Kliniklabor der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Tübingen.

### **2.6.2.1 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mittels MAB anti TK1 XPA-210**

Die folgenden Versuchsschritte fanden bei Raumtemperatur statt, alle Reagenzien wurden dafür vor Arbeitsbeginn auf Raumtemperatur gebracht.

Die zuvor erstellten Paraffinschnitte wurden zunächst über Nacht bei 37°C getrocknet. Vor Färbebeginn wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt, um das Paraffin abzuschmelzen.

Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Schnitte zunächst für 3x10min in Xylol sowie anschließend mittels einer absteigenden Alkoholreihe von 100% (2x7min), 96% (2x7min) und 70% (1x7min) Ethanol. Die Rehydrierung dient dabei der Wiederherstellung der Antigenpräsentation, welche durch die Fixierung in Paraffin abgeschwächt wurde.

Nach der Rehydrierung folgte das Waschen mittels *Aqua dest.* (1x5min).

Die anschließende Demaskierung zur Intensivierung der immunhistochemischen Färbung erfolgte für 15 Minuten in der Mikrowelle (Moulinex Mikro-Chef MO 500, Moulinex, Alençon, France) mittels eines 10mM Citratpuffers, welcher aus den Stammpuffern Zitronensäure (18%) und Natriumcitrat (82%) angesetzt wurde. Dabei fanden regelmäßige pH-Kontrollen statt, um einen pH von 6,0 beizubehalten.

Nach Abkühlung bei Raumtemperatur folgten weitere Waschvorgänge (2x5min), nun mit TBST (0,5mol Triss; 0,3mol NaCl; 0,1% Tween 20). Waschungen mit TBST für 3x5 Minuten erfolgten im Anschluss nach jedem der folgenden Inkubationsschritte mittels Antikörpern oder Enzymen.

Durch eine zehnminütige Inkubation mit einigen Tropfen des Reagenz Dako S2003 (Dako, Glostrup, Denmark) wurde ein dualer endogener Enzymblock der endogenen Peroxidase und der alkalischen Phosphatase erreicht. Diese Enzyme sind in vielen Zellen des Blasenepithels vorhanden. Durch Blockierung

dieser wird eine Minimierung von unspezifischen Hintergrundreaktionen bei der Färbung erreicht.

Nach erneuter Waschung erfolgte nun die erste Färbung mit dem Primärantikörper. Verwendet wurde dabei der mouse-Primärantikörper MAB anti TH1 XPA-210, SSTK, clone 5 der Firma AroCell AB (AroCell AB, Uppsala, Sweden). In einer Verdünnung von 1:200 mit dem Verdünnungsmedium Dako S3022 (Dako, Glostrup, Denmark) wurde dabei für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein dritter Waschvorgang mit TBST folgte. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte nach dem Verfahrensprinzip des EnVision™G/2 System/AP (Dako, Glostrup, Denmark) und wurde entsprechend den Vorschriften angewendet.

Die Inkubation mit dem LINK-Antikörper (rabbit/mouse) des EnVision-Testkits erfolgte für 30 Minuten, anschließend eine erneute Waschung mittels TBST.

Zur Verstärkung der Färbung führt das anschließende Enhancement mittels AP-Enzymen (EnVision) bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Eine Waschung mit TBST (3x5min) wurde angeschlossen.

Als letzter, wichtiger Inkubationsschritt folgte die Zugabe des Farbstoffes zur Sichtbarmachung der vorherigen Antigen-Antikörper-Reaktionen. Als Farbstoff diente bei dieser 12-minütigen Inkubation Permanent Red, hergestellt aus einer Arbeitslösung aus 1000ul Permanent Red Substrat und 10ul Permanent Red Chromogen (EnVision). Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend mittels *Aqua dest.* abgespült. Als Gegenfärbung folgte eine kurze 15-sekündige Färbung mittels Hämatoxylin nach Meyer (Romeis, 2010). Überschüssiges Hämatoxylin wurde ebenfalls mit *Aqua dest.* abgespült. Anschließend erfolgte für 7 Minuten Bläuen in Leitungswasser.

Die Objektträger wurden abschließend mit dem Aquatex der Firma Merck (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Als Positivkontrolle diente parallel der Schnitt einer Tonsille.

### **2.6.2.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung mittels Rabbit Anti-PTOV1-AK**

Die Entparaffinierung und Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe wurde für PTOV1 analog zur Färbung mittels XPA-210 vorgenommen. Zur Minimierung von Hintergrundreaktionen erfolgte nun ein Peroxidaseblock für 20 Minuten mit 3%igem Wasserstoffperoxid. Anschließend folgte eine Waschung mit *Aqua dest.* (1x5 min).

Die 45-minütige Demaskierung erfolgte auch hier mit Hilfe eines Citratpuffers in einem Dampfgarer (MultiGourmet, Braun, Bahlingen, Germany). Eine Waschung mit TBST (0,05M Triss pH7,6; 0,15M NaCl; 0,1% Tween 20) für 2x5 Minuten folgte.

Als Blocklösung wurde das Protein Block-Serum-Free X0909 der Firma Dako (Dako, Glostrup, Denmark) verwendet, welches nach 10 Minuten abgekippt wurde.

Über Nacht und im Kühlschrank bei 4°C erfolgte nun die Inkubation mit dem Primärantikörper. Verwendet wurde hierzu der Rabbit Anti-PTOV1 AK Polyclonal rabbit (bs-2313R) der Firma Bioss (Bioss Inc., Woburn, USA) in einer Verdünnung von 1:150 mit dem Verdünnungsmedium Dako Diluent S0809 (Dako, Glostrup, Denmark). Eine Waschung mit TBST (3x5 min) wurde angeschlossen. Als Sekundärantikörper fungierte der Advance HRP Link (anti rabbit SAK aus dem benutzten Kit ADVANCE HRP K4067 (Dako, Glostrup, Denmark) (Inkubationszeit 30 Minuten bei Raumtemperatur). Nach erneuter Waschung mittels TBST (3x5 min) erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Advance HRP Enzym bei Raumtemperatur gefolgt von einer weiteren Waschung mittels TBST (3x5 min).

Als Farbsubstrat zur Sichtbarmachung der zugrundeliegenden Reaktion diente das Liquide DAB+ Substrat Chromogene System der Firma Dako (Code K3467, Dako, Glostrup, Denmark), hergestellt aus 1000ul Pufferlösung und 20ul Diaminobenzidin. Die Inkubation erfolgte hierbei für drei Minuten. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Hilfe von *Aqua dest.* (2x5min) entfernt. Als Gegenfärbung folgte eine 40-sekündige Färbung mit Hämatoxylin nach Meyer (Romeis, 2010) mit anschließendem Bläuen (7min) in Leitungswasser. Zur

Dehydrierung erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe (2x3 min 96% Ethanol, 2x5 min 100% Ethanol) und die Behandlung mit Xylol (3x5 min). Abschließend wurde der gefärbte Paraffinschnitt mit Hilfe des VectaMount der Firma Vector Linaris (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

## **2.6.3 Auswertung der Immunhistochemie**

### **2.6.3.1 Dokumentation**

Für jeden der 4 erstellten TMAs wurde ein separates Dokumentationsblatt erstellt.

Jedem einzelnen Dot wurde hierbei die K-Nummer der Pathologie sowie die Blocknummer des Paraffinblockes, aus welchem das Material entnommen wurde, zugeordnet. Durch Zuordnung alleine der K-Nummer konnte der TMA ohne Kenntnis der Eigenschaften des zu untersuchenden Gewebes, wie zum Beispiel dem zugehörigen TNM-Stadium, bearbeitet werden.

Beobachtungen, die beim Auswerten der immunhistochemischen Färbungen des TMA gemacht wurden, wurden auf das Dokumentationsblatt übertragen.

### **2.6.3.2 Mikroskopische Evaluation der immunhistochemischen Färbungen**

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte durch Mikroskopie. Verwendet wurden dabei Lichtmikroskope der Firma Zeiss (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Die Auszählung der Zellzahl erfolgte für XPA-210 mit Hilfe einer 100-fachen Vergrößerung, die Beurteilung der zellulären Verteilung mit 400facher Vergrößerung, die Beurteilung von PTOV1 erfolgte unter 400-facher Vergrößerung.

Mikroskopiert wurde dabei bei allen Färbungen in jeweils zwei separaten Durchgängen ohne Kenntnis der Ergebnisse des vorherigen Mikroskopierdurchganges. Anschließend wurden die Ergebnisse verglichen und bei Abweichungen erneut mikroskopiert.

#### **2.6.3.2.1 Evaluationskriterien für XPA-210**

Die Auswertung der Immunhistochemie für den Marker XPA-210 erfolgte anhand eines quantitativen Auswerteverfahrens. Ermittelt wurde hierbei der Anteil gefärbter Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl, somit also der prozentuale Anteil gefärbter Zellen.

Zur Bestimmung der Zellzahl in charakterisierten Gruppen erfolgte die Auszählung von jeweils fünf beispielhaften Dots und die anschließende Bildung eines Mittelwertes. Die gefärbten Präparate wurden dabei semiquantitativ in drei Gruppen bezüglich der Zellzahl eingeteilt (geringe, mittlere und hohe Zellzahl).

Bei nicht vollständig getroffenen Dots oder solchen mit hohem Anteil an tumorfreiem Gewebe, insbesondere hohem Bindegewebsanteil, erfolgte die Aufrechnung aufs Ganze (Bsp: 50% Tumorgewebe, 50% Bindegewebe oder nur halber Dot getroffen → Gesamtzellzahl/2). Ebenso verfahren wurde auch beim Auszählen des Urothels in Normalgewebeblöcken.

Anschließend wurden in allen Dots die gefärbten (positiven) Zellen ausgezählt und abschließend in Bezug zur Gesamtzellzahl (ermittelt als semiquantitativ klassifizierte Gruppe) gesetzt.

Zusätzlich wurde auch die zelluläre Verteilung dokumentiert. Die Dots wurden eingeteilt in solche mit rein nukleärer Färbung (=0), solche mit nukleärer Färbung und zusätzlich leichter zytoplasmatischer Färbung (=1) und solche mit nukleärer Färbung und zusätzlich deutlicher zytoplasmatischer Färbung (=2).

#### **2.6.3.2.2 Evaluationskriterien für PTOV1**

Die Auswertung der Immunhistochemie für den Marker PTOV1 erfolgte ebenfalls anhand eines semiquantitativen Auswerteverfahrens.

Ziel hierbei war es, möglichst viele verschiedene Eigenschaften der Gewebe durch Unterschiede im Färbeverhalten herauszuarbeiten. Da sich die Färbung von PTOV1 hinsichtlich der Flächenausbreitung in den einzelnen Dots nur wenig unterschied, wurde ein individuell erarbeiteter Auswertemodus gewählt.

Dafür wurden die einzelnen Dots zunächst hinsichtlich ihrer Färbeintensität untersucht und in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. In Gruppe 1 fielen diejenigen Dots, die nur eine geringe Anfärbung mittels des Markers PTOV1

zeigten, in Gruppe 2 diejenigen mit mittlerer Färbeintensität und in Gruppe 3 solche mit hoher Färbeintensität. Dabei wurden die Tumorzellen für die Bewertung der Färbeintensität zunächst als Ganzes und unabhängig von der zellulären Verteilung des Markers betrachtet.

Anschließend erfolgte dann eine genauere Betrachtung der zellulären Verteilung in Hinblick auf die zytoplasmatische und nukleäre Expression. Beobachtet wurde, in wie weit die betrachteten Zellen homogen, also sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär gefärbt waren, oder aber, ob sich viele Zellen mit wenig kernständiger Färbung und somit rein zytoplasmatischer Expression zeigten. Unterschieden wurden hierbei Gewebe, in denen alle Zellen ausschließlich zytoplasmatisch gefärbt waren, also alle Zellen keine Kernfärbung zeigten (=0), nur wenige Zellen eine kernständige Färbung zeigten (=1), viele Zellen auch kernständig gefärbt waren (=2) oder aber alle Zellen homogen zytoplasmatisch und nukleär gefärbt waren (=3). Als cut-off-Werte wurden hierbei 1 < 25% kernständig gefärbte Zellen und 2 = 25-90% kernständig gefärbte Zellen gewählt. Alles Gewebe mit > 90% kernständige gefärbten Zellen wurde als homogen betrachtet. Zur besseren Vergleichbarkeit galten dabei für Tumorgewebe und Normalgewebe die gleichen cut-off-Werte.

#### **2.6.3.2.3 Bestätigung der Dignität**

Zur Bestätigung der Dignität des Normalgewebes, also um sicherzustellen, dass es sich bei dem untersuchten Normalgewebe auch wirklich um reines Normalgewebe ohne neoplastische Veränderungen handelt, erfolgte anschließend noch eine Immunfärbung mittels p53 und CK20.

P53 ist ein Tumorsupressorprotein, welches im Falle einer Neoplasie häufig im Urothel mutiert ist. Somit ermöglicht es zwischen reaktiven Veränderungen, zum Beispiel im Sinne eines CIS und Entzündungen zu differenzieren. (Mallofre et al., 2003) Normalgewebe bzw. Gewebe mit lediglich entzündlichen Veränderungen zeigt demnach keine Expression, maligne Veränderungen stellen sich als Braunfärbung der betroffenen Zellen dar.

CK20 wird normalerweise nur in den „umbrella cells“ des Urothels exprimiert, kann jedoch im Fall einer Neoexpression das gesamte Epithel betreffen.

(Mallofre et al., 2003) Eine CK20-Expression stellt sich ebenfalls als Braunfärbung dar.

#### **2.6.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des statistischen Auswerteprogrammes JMP (Version 10.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Gearbeitet wurde mit stetigen, nominalen und ordinalen Einfluss- und Zielgrößen.

Für die Einflussgrößen Geschlecht, Alter bei Operation, Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Ausmaß der Metastasierung, Grading, Ausmaß der Resektion, zeitgleiches Vorliegen eines CIS sowie das Durchführen einer Chemotherapie wurden Häufigkeitsverteilungen incl. Quartile und statistische Kenngrößen (Median, Mittelwert, Standardabweichung) erhoben.

Auch für die jeweiligen untersuchten Zielgrößen, also die Zellzahl der gefärbten Zellen, die nukleäre Lokalisation sowie die Färbeintensität wurden Häufigkeitsverteilungen und statistische Kerngrößen erhoben. Anschließend folgten die Interaktion der Zielgrößen für die jeweiligen Färbungen mittels linearer Regressionsanalyse sowie der Vergleich der Zielgrößen in Tumor- und Normalgewebe mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Kruskal und Wallis, 1952) und damit einhergehender Chi-Quadrat-Approximation (Helmert, 1876).

Die Gegenüberstellung der Zielvariablen mit Patientencharakteristika wie Alter und Geschlecht und klinischen Daten wie T, N, M, G erfolgte in univariaten Analysen mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Kruskal und Wallis, 1952). Der Vergleich von ordinalen Variablen untereinander folgte mittels Chi-Quadrat-Tests.

Zur besseren Beurteilbarkeit folgte zudem der Vergleich in Subgruppen. Hierbei wurden die Tumorstadien zusammengefasst in die Subgruppen T=2, und T>2, das Alter in Alter < sowie  $\geq$  Median (=68 Jahre).

Auch für die Verlaufsdaten des Follow-up wurden Häufigkeitsverteilungen und statistische Kerngrößen erhoben.

Die Korrelation der Expression der Parameter im Tumorgewebe mit den Daten des Krankheitsverlaufes erfolgte anschließend jeweils für die drei Ereignisse Wiederauftreten der Erkrankung, tumorspezifisches Überleben und Gesamtüberleben mittels Cox Proportional Hazard (Cox, 1972). Die Darstellung der Sachverhalte erfolgte durch Kaplan-Meyer-Kurven (Kaplan und Meyer, 1958) mit Berechnung der statistischen Unterschiedlichkeit mittels Log Rank Test (Mantel, 1966).

Bei all jenen Parametern, bei denen mit Hilfe der Expression des Markers Vorhersagen über den Verlauf der Erkrankung getroffen werden konnten, folgten multivariate Analysen mittels Cox Proportional Hazard (Cox, 1972) um zu überprüfen, ob der nachgewiesene Effekt auch unabhängig von anderen (starken) Prädiktoren auftritt.

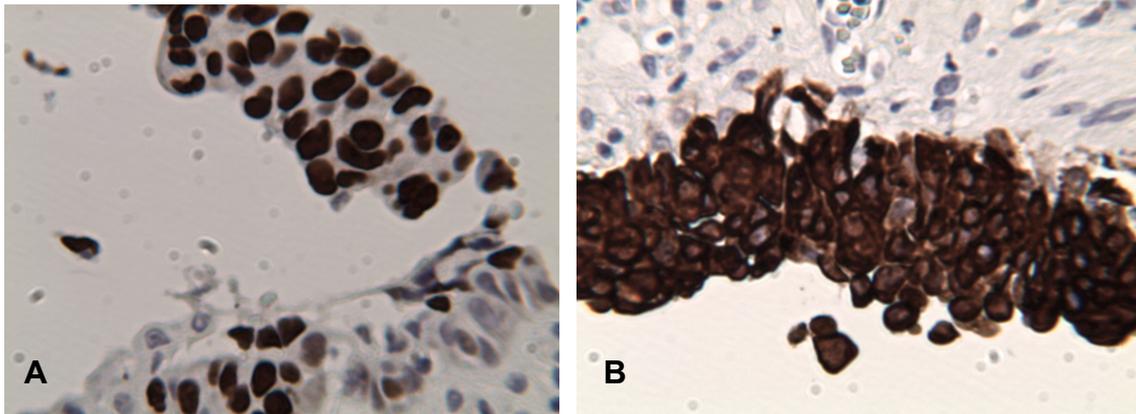
Das festgelegte Signifikanzniveau in den statistischen Test betrug 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Patientenkollektiv:**

Das Grundkollektiv umfasste 299 Patienten, welche sich an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen einer radikalen Zystektomie unterzogen haben. Von diesem Kollektiv mussten 188 Patienten ausgeschlossen werden. Größtes Ausschlusskriterium war ein Zeitpunkt der Zystektomie vor 1/1996, da für diese Patienten nicht mehr auf Paraffinblöcke zurückgegriffen werden konnte. Von wenigen weiteren Patienten waren auch für den Zeitpunkt zwischen 1996 und 2006 keine Paraffinblöcke auffindbar. Weitere Ausschlusskriterien waren unvollständige Pathologieberichte und somit die fehlende Möglichkeit das genaue Tumorstadium zu erheben, das Vorliegen von anderen Blasen-Tumorentitäten als urothelialen Tumoren (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, (Leiomyo-)Sarkom, Neurofibrom) oder das (teilweise zeitgleiche) Auftreten von Tumoren anderer Genese (Prostatakarzinom, Zervixkarzinom, Rektumkarzinom, Nierenbeckenkarzinom) mit Infiltration der Harnblase.

Die Normalgewebe von zwei Patienten zeigten eine Expression von p53 und CK20 (siehe Abb. 6), woraufhin von einem Vorliegen zumindest eines CIS ausgegangen werden musste. Dementsprechend wurde das Normalgewebe dieser Patienten für diese Studie nicht berücksichtigt.



**Abb. 6 A,B:** Normalgewebe, Vergrößerung 1:400, A: p53-Expression (dargestellt als Braunfärbung der Zellen); B: CK20-Expression (dargestellt als Braunfärbung der Zellen).

Das abschließende Patientenkollektiv umfasste 111 Patienten. Hierin eingeschlossen waren Patienten, welche sich im Zeitraum von Januar 1996 bis Dezember 2006 an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen aufgrund eines muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinoms einer Zystektomie unterzogen und ein Tumorstadium  $T \geq 2a$  aufwiesen.

Von 102 der 111 Patienten flossen Daten vom Zeitpunkt der Zystektomie in die Studie ein, bei 9 Patienten musste hingegen auf Daten einer vorhergegangenen TUR-B zurückgegriffen werden, da bei diesen Patienten zum Zeitpunkt der Zystektomie kein muskelinfiltrierendes Harnblasenkarzinom mehr nachgewiesen werden konnte.

### **3.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung:**

Von den 111 untersuchten Patienten waren 85 Patienten männlich und 26 weiblich, was einem Geschlechterverhältnis von 76,6% zu 23,4% entspricht (siehe Tabelle 6).

Zum Zeitpunkt der Operation war der jüngste Patient 32 und der älteste Patient 84 Jahre alt, das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation betrug 65,5 Jahre mit einer Standardabweichung von 10,7 Jahren, der Median lag bei 68 Jahren.

### **3.1.2 TNM-Stadium und Grading**

Bei allen 111 Patienten konnte das Maß der Gewebeausbreitung in Form des T-Stadiums ermittelt werden. Die Hälfte der Patienten befand sich zum Zeitpunkt der Operation im Stadium T3 (je 22,5% (n=25) T3a und T3b), das niedrigste muskelinfiltrierende Stadium T2a zeigten 17,1% (n=19) der Patienten, dem stärksten Ausbreitungsstadium T4b gehörten 5,4% (n=6) der Patienten an.

Bei 107 der 111 Patienten konnte der Status des Lymphknotenbefalls zum Operationszeitpunkt nachvollzogen werden. 61,7% (n=66) der Patienten zeigten keinen Lymphknotenbefall, dem Stadium N1 waren 22,4% (n=24) der Patienten, dem Stadium N2 14% (n=15) der Patienten und dem Stadium N3 1,9% (n=2) der Patienten zuzuordnen.

Bei 108 der 111 Patienten konnte das Metastasierungsstadium zum Operationszeitpunkt ermittelt werden. 91,7% (n=99) der Patienten zeigten keine Metastasierung, bei 8,3% (n=9) der Patienten fanden sich zum Zeitpunkt der Operation bereits Fernmetastasen.

Bei allen 111 Patienten gelang eine Einstufung der Gewebedifferenzierung in Form des Grading. 25,2% (n=28) der Patienten zeigten ein Grading von 2, 74,8% (n=83) konnten dem höchsten Grading G3 zugeordnet werden. G1 Tumoren waren unter den muskelinfiltrierenden Karzinomen nicht nachweisbar. Die Verteilungen sind ebenfalls der Tabelle 6 zu entnehmen.

### **3.1.3 Weitere Parameter**

Zusätzlich zu TNM-Stadium und Grading wurde noch das Resektionsstadium zum Zeitpunkt der Zystektomie untersucht. Bei 82,8% (n=92) der Patienten gelang eine histologisch nachgewiesene vollständige Resektion des Tumors (R0), 14,4% (n=16) der Patienten zeigten einen histologisch nachweisbaren Resttumor (R1), bei 2,7% (n=3) der Patienten konnte der Resttumor bereits makroskopisch gesehen werden (R2) (siehe Tabelle 6).

Des Weiteren wurde untersucht, ob zusätzlich zum Tumor noch ein CIS im Operationspräparat nachgewiesen werden konnte. Bei 27,0% (n=30) der

Patienten lag zusätzlich ein CIS vor, bei 73,0% (n=81) der Patienten war kein zusätzliches CIS dokumentiert.

25,2% (n=28) der Patienten erhielten postoperativ eine adjuvante Chemotherapie, bei 74,8% (n=83) der Patienten war dieses entweder nicht dokumentiert oder sie erhielten postoperativ keine weitere Chemotherapie.

Parameter	n (%)
Geschlecht, n (%)	
männlich	85 (76,6%)
weiblich	26 (23,4%)
Alter zum Zeitpunkt der Operation, median	68
Tumorinfiltration, n (%)	
T2a	19 (17,1%)
T2b	17 (15,3%)
T3a	25 (22,5%)
T3b	25 (22,5%)
T4a	19 (17,1%)
T4b	6 (5,4%)
Lymphknotenstatus, n (%)	
N0	66 (61,7%)
N1	24 (22,4%)
N2	15 (14,0%)
N3	2 (1,9%)
Metastasierungsstatus, n (%)	
M0	99 (91,7%)
M1	9 (8,3%)
Grading, n (%)	
G1	0 (0%)
G2	28 (25,2%)
G3	83 (74,8%)
Resektionsausmaß, n (%)	
R0	92 (82,8%)
R1	16 (14,4%)
R2	3 (2,7%)

**Tab. 6:** Charakteristika des Patientenkollektivs, n=111 (Ausnahme: N: n=107, M: n=108).

## **3.2. Beschreibung der Expression und der zellulären Verteilung**

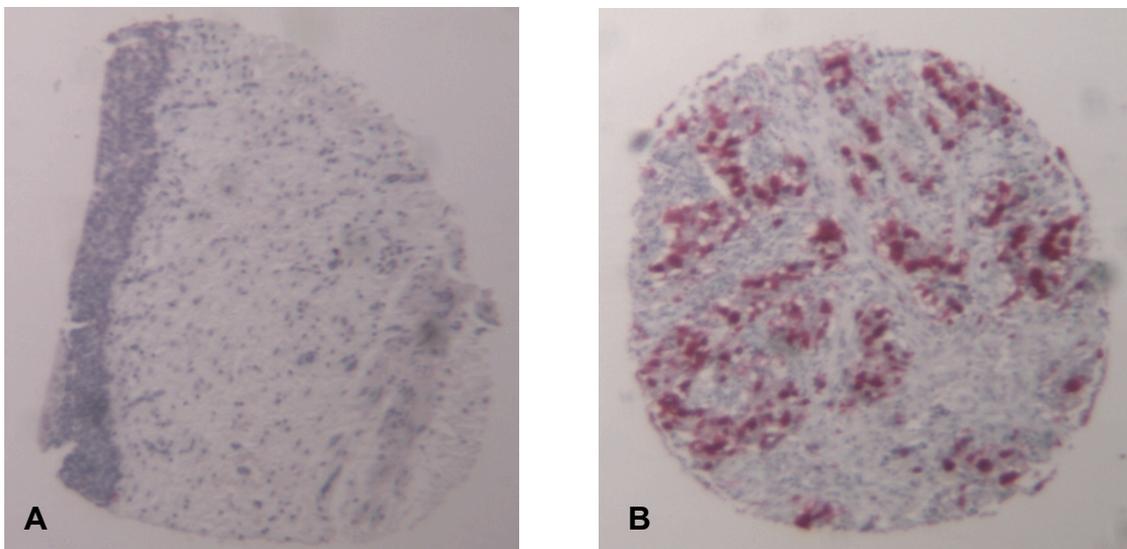
### **3.2.1 XPA-210**

#### **3.2.1.1 Deskription**

Die XPA-210-Expression zeigte sich aufgrund des verwendeten Farbstoffes als Rot / Pinkfärbung der betroffenen Zellen (siehe Abb. 7B).

Eine Expression konnte in unterschiedlichem Ausmaß sowohl im benignen Gewebe als auch im Tumorgewebe festgestellt werden. Es fand sich dabei insbesondere im Urothel eine Expression, wobei diese in allen Gewebeschichten also sowohl luminal als auch basal beobachtet werden konnte.

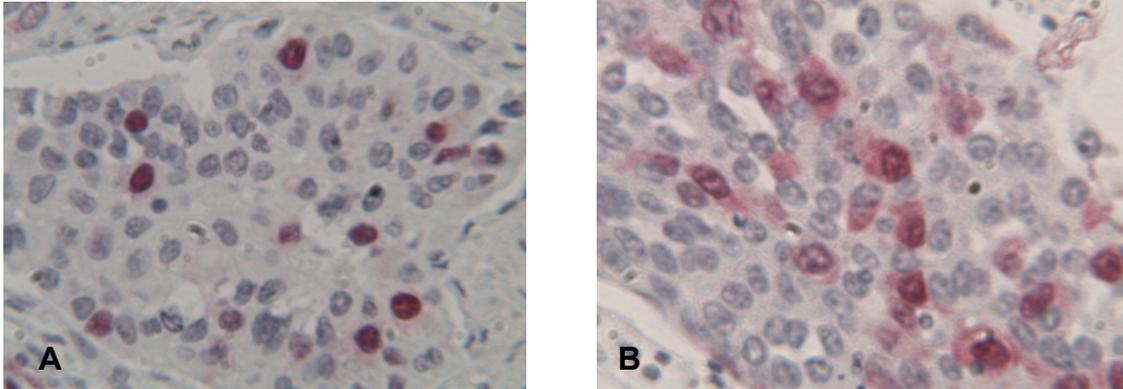
Es zeigten sich geringe unspezifische Hintergrundreaktionen, weiterhin waren neben den Urothelzellen zum Teil auch Leukozyten und Makrophagen angefärbt.



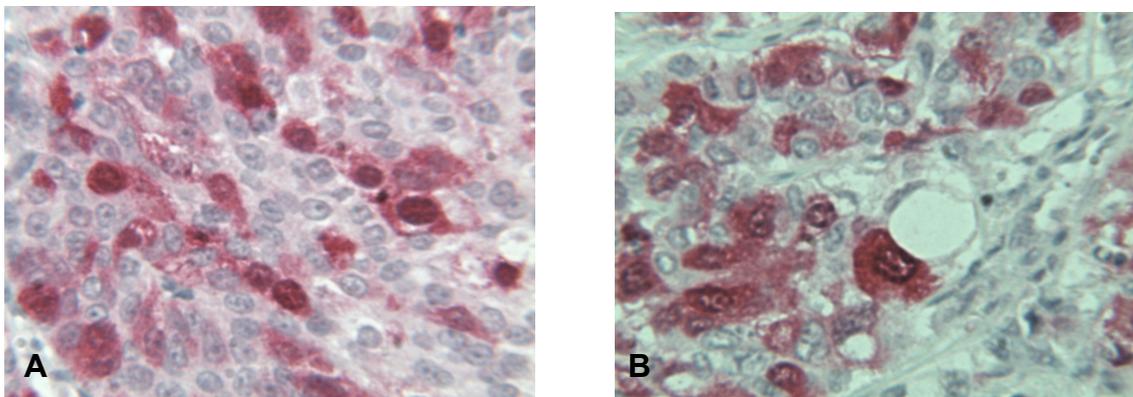
**Abb. 7 A,B:** XPA-210-Färbung (dargestellt als Rotfärbung der Zellen), Vergrößerung: 1:40 A:: Übersicht Normalgewebe, B: Übersicht Tumorgewebe.

Eine Expression von XPA-210 konnte insbesondere in den Zellkernen der Urothelzellen beobachten werden (siehe Abb. 8A). Es fielen jedoch auch

Gewebe mit zusätzlich zur nukleären Komponente vorkommender zytoplasmatischer Expression auf. Hierbei konnte zwischen Geweben mit geringer (siehe Abb. 8B) und mit ausgeprägter zytoplasmatischer Komponente unterschieden werden (siehe Abb. 9).



**Abb. 8 A,B:** XPA-210-Färbung (dargestellt als Rotfärbung der Zellen), Vergrößerung: 1:400 A: nukleäre Expression, B: nukleäre und zusätzlich geringe zytoplasmatische Expression.



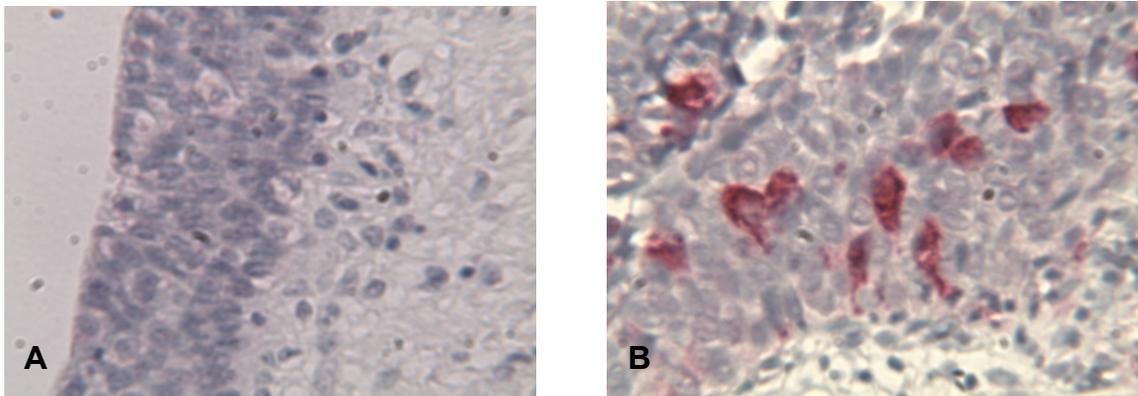
**Abb. 9 A,B:** XPA-210-Färbung (dargestellt als Rotfärbung der Zellen), Vergrößerung 1:400, Zellen mit nukleärer und starker zytoplasmatischer Expression.

Im Tumorgewebe fand sich dabei eine breite Variabilität der Expression, sowohl hinsichtlich der Anzahl der gefärbten Zellen als auch hinsichtlich der subzellulären Verteilung. Auffällig war ein häufig zu beobachtender Zusammenhang zwischen dem Anteil der gefärbten Zellen und der zellulären

Verteilung. In Geweben mit nur vereinzelt gefärbten Zellen zeigte sich vornehmlich eine nukleäre Expression, in Geweben mit vielen gefärbten Zellen ließ sich eine vermehrte zytoplasmatische Komponente detektieren.

Die statistische Auswertung der visuellen Eindrücke sowie ein Bezug der Expression zu Tumorstadium und Grading sind im Verlauf beschrieben.

In benignem Gewebe fand sich insgesamt deutlich seltener eine Expression. Bis auf wenige Ausnahmen war das Urothel gar nicht angefärbt (siehe Abb. 10A).



**Abb. 10 A,B:** XPA-210-Färbung (dargestellt als Rotfärbung der Zellen), Vergrößerung 1:400, Normalgewebe. Abb. A: keine XPA-210 Expression; Abb. B: starke zytoplasmatische Expression.

Demgegenüber zeigte sich sehr vereinzelt aber auch Normalgewebe mit einer ausgeprägten Expression. Hierbei fiel hinsichtlich der subzellulären Verteilung neben der nukleären Komponente eine starke Expression auch im Zytoplasma auf (siehe Abb. 10B).

### **3.2.1.2 Statistische Auswertung**

Zielgrößen bei der Färbung XPA-210 waren die Anzahl der gefärbten Zellen pro 100 Zellen sowie die subzelluläre Verteilung des Markers, untersucht jeweils im Tumor- wie auch im Normalgewebe.

### **3.2.1.2.1 Verteilung der Zielgröße Zellzahl/100**

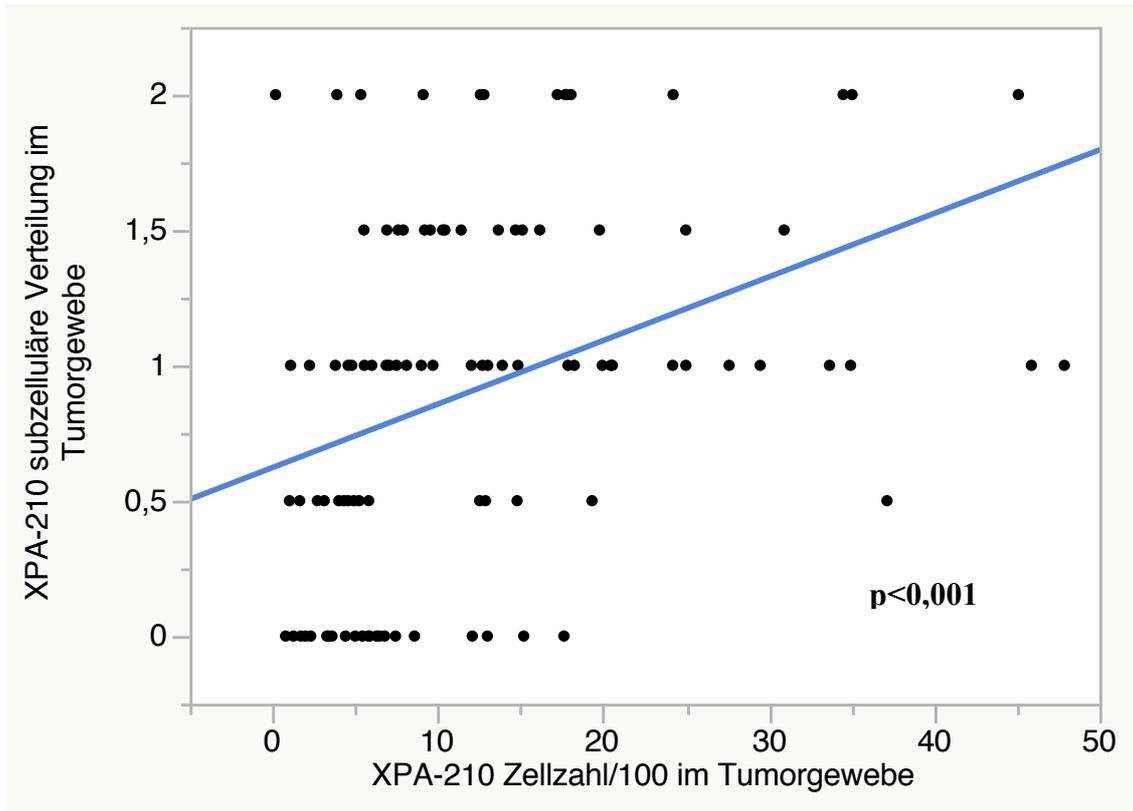
Die Zellzahl der gefärbten Zellen lag im Tumorgewebe zwischen 0 und 48 gefärbten Zellen pro 100 Zellen mit einem Median von 8,3 und einem Mittelwert von 12 Zellen bei einer Standardabweichung von 10,5 Zellen. Im Normalgewebe lag die Zellzahl der gefärbten Zellen zwischen 0 und 73 Zellen pro 100 Zellen mit einem Median von 0,4 und einem Mittelwert von 2,4 Zellen bei einer Standardabweichung von 9,1 Zellen. Dabei konnten in 29% der untersuchten Normalgewebe keine gefärbten Zellen nachgewiesen werden. Der hohe Wert von 73 Zellen wurde lediglich in einem Normalgewebe gefunden, wohingegen die zweithöchste Zellzahl im Normalgewebe bei 9 von 100 untersuchten Zellen lag.

### **3.2.1.2.2 Verteilung der Zielgröße der subzellulären Lokalisation**

Bei Betrachtung der subzellulären Verteilung zeigte sich sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe eine Verteilung auf alle drei Gruppen der Zielgröße mit einem Mittelwert von 0,91 bei einer Standardabweichung von 0,66 im Tumorgewebe sowie einem Mittelwert von 0,55 bei einer Standardabweichung von 0,64 im Normalgewebe. Im Tumorgewebe wurde dabei am häufigsten eine überwiegend nukleäre mit geringem Anteil an zytoplasmatischer Färbung, gefolgt von einer rein nukleären Färbung beobachtet. Am wenigsten häufig war eine nukleäre Färbung mit starkem zytoplasmatischen Anteil zu sehen. Demgegenüber fand sich im Normalgewebe überwiegend eine rein nukleäre Anfärbung. Am zweithäufigsten wurde eine nukleäre Anfärbung mit zusätzlich wenig zytoplasmatischem Anteil beobachtet, am seltensten war eine nukleäre Anfärbung mit starker zytoplasmatischer Komponente zu beobachten.

### **3.2.1.2.3 Interaktion der beiden Zielgrößen**

Bei Betrachtung der Interaktion der beiden Zielvariablen Zellzahl/100 und nukleäre Lokalisation in der linearen Regressionsanalyse ließ sich für XPA-210 ein signifikanter Zusammenhang nachweisen ( $p < 0,0001$ ). Eine niedrige Zellzahl zeigte sich dabei häufig bei einer überwiegend nukleären Expression, eine hohe Zellzahl bei einer zusätzlich starken Expression im Zytoplasma (siehe. Abb. 11).

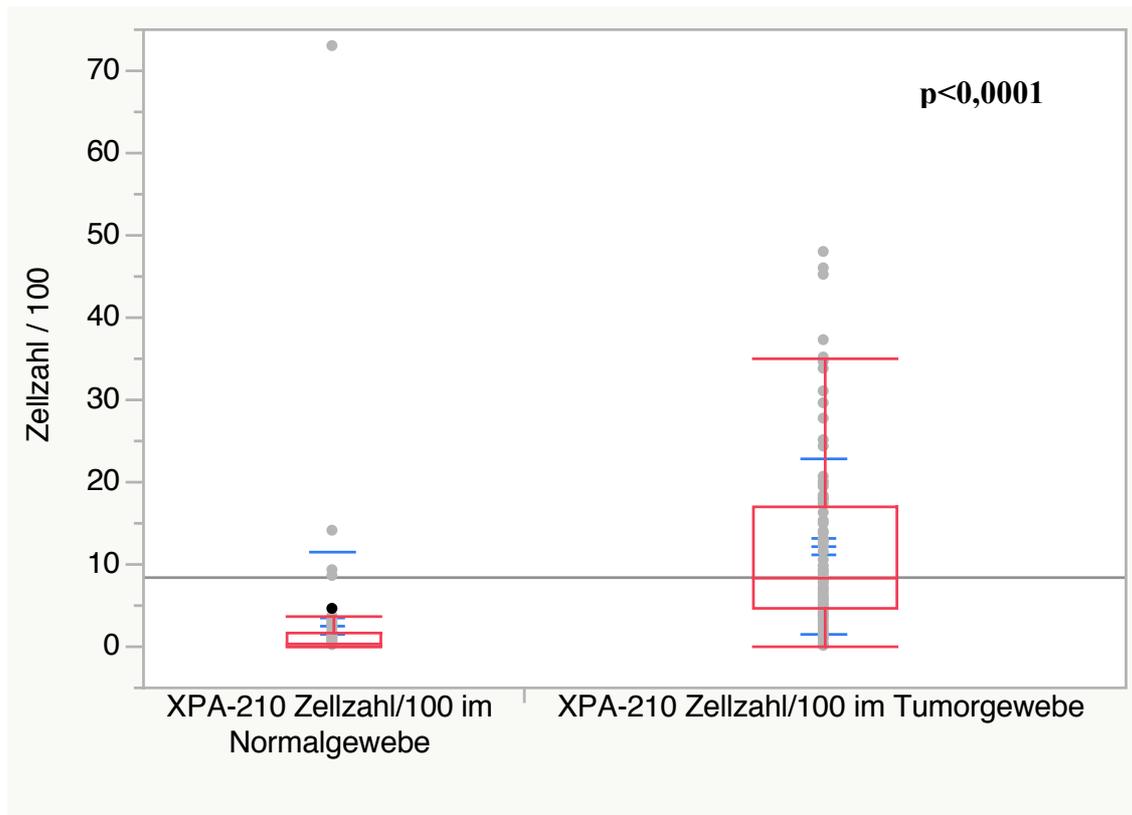


**Abb. 11:** Zusammenhang der beiden Zielvariablen (subzelluläre Verteilung vs. Zellzahl/100) für XPA-210 im Tumorgewebe der Harnblase mittels linearer Regressionsanalyse ( $p < 0,0001$ ).

Bei Betrachtung des Normalgewebes zeigte sich kein signifikanter Einfluss.

#### **3.2.1.2.4 Vergleich der Zielgröße Zellzahl/100 in Tumoren und Normalgewebe**

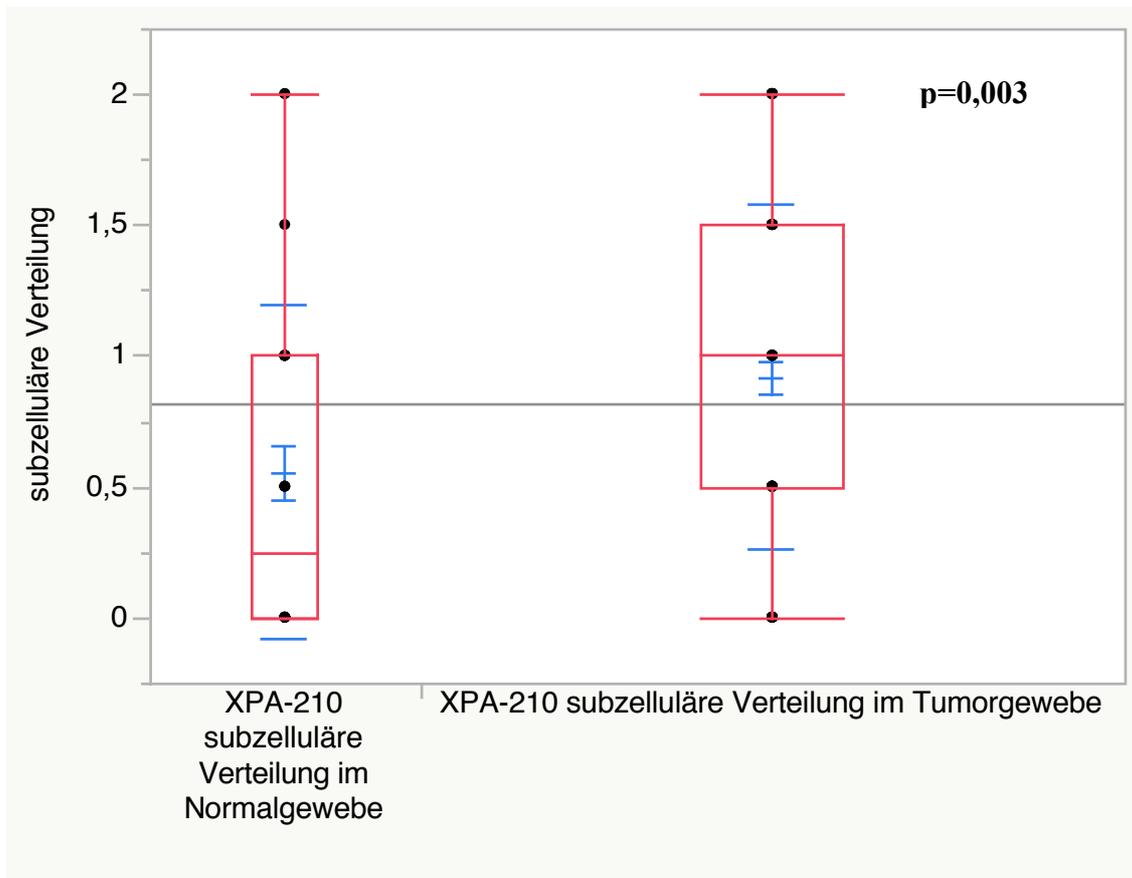
Der Vergleich der Zielgröße Zellzahl / 100 Zellen in Tumor- und Normalgewebe in der einfaktoriellen Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test zeigte mit  $p < 0,0001$  einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 12). Dabei fand sich im Tumorgewebe eine hohe Anzahl an gefärbten Zellen, im Normalgewebe exprimierten nur wenige Zellen XPA-210.



**Abb. 12.:** Vergleich der Expression von XPA-210 in Normal- und Tumorgewebe des Blasenkarzinomes mittels Zellzahl pro 100 Zellen, einfaktorielles Analyse ( $p < 0,0001$ , Wilcoxon-Test).

### **3.2.1.2.5 Vergleich der Zielgröße der subzellulären Lokalisation in Tumoren und Normalgewebe**

Der Vergleich der zellulären Lokalisation von XPA-210 in Tumor- und Normalgewebe in der einfaktorielles Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test zeigte mit  $p = 0,003$  einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 13). Dabei fand sich im Normalgewebe eine vorwiegend nukleäre Expression, im Tumorgewebe war neben der nukleären auch eine zytoplasmatische Komponente zu finden.



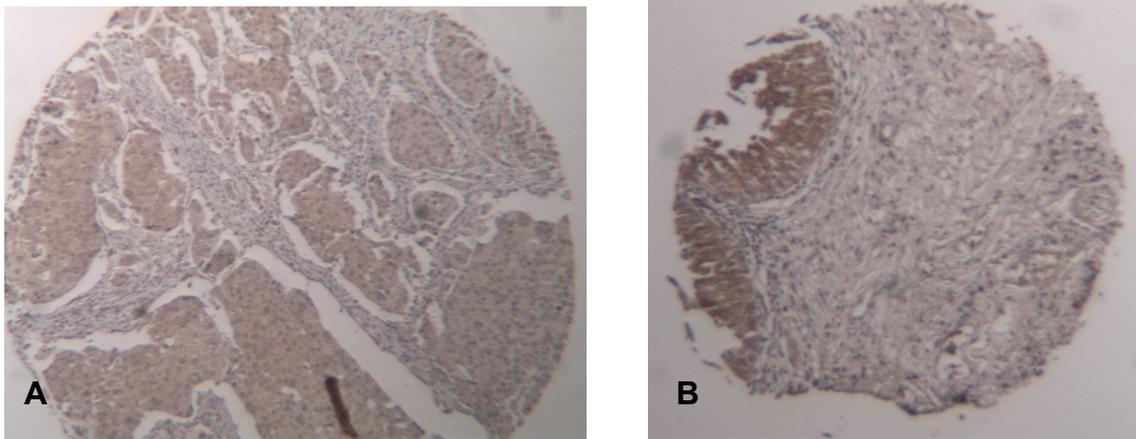
**Abb 13:** Vergleich der Expression von XPA-210 in Normal- und Tumorgewebe des Blasenkarzinomes mittels subzellulärer Verteilung, einfaktorische Analyse ( $p=0,003$ , WilcoxonTest).

## 3.2.2 PTOV1

### 3.2.2.1 Deskription

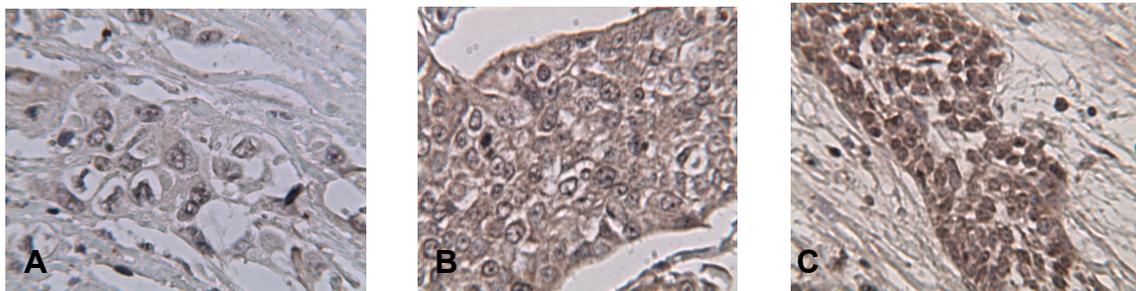
Die PTOV1-Expression zeigte sich aufgrund des hier verwendeten Farbstoffes als Braunfärbung der betroffenen Zellen (siehe Abb. 14).

Eine Expression konnte in unterschiedlichem Ausmaß sowohl im benignen Gewebe als auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden, insbesondere das Urothel betreffend. Vereinzelt fiel luminal eine verstärkte und basal eine eher schwache Färbung auf.



**Abb. 14 A,B:** PTOV1-Färbung (dargestellt als Braunfärbung der Zellen), Vergrößerung 1:40, Übersicht Tumorgewebe.

Im Tumorgewebe fanden sich Zellen jeglicher Färbeintensität (siehe Abb. 15). Bezüglich der subzellulären Verteilung konnten Zellen mit einer rein cytoplasmatischen Expression, aber auch solche mit Färbung in beiden Kompartimenten (Zytoplasma und Zellkern) gesehen werden. Eine rein nukleäre Lokalisation wurde nicht beobachtet. Dennoch schien im Vergleich zum Normalgewebe der Zellkern im Tumorgewebe häufiger mitbetroffen zu sein (siehe Abb. 15C).



**Abb. 15 A,B,C:** PTOV1-Färbung (dargestellt als Braunfärbung der Zellen), Vergrößerung 1:400 A: Färbeintensität 1; B: Färbeintensität 2, nukleäre und zytoplasmatische Expression; C: Färbeintensität 3, starke nukleäre Komponente.

Auch im Normalgewebe fand sich ein hoher Anteil an PTOV1-exprimierenden Zellen. Dabei fiel überwiegend eine sehr starke Färbeintensität auf. Hinsichtlich

der subzellulären Lokalisation zeigte sich ein hoher Anteil zytoplasmatisch gefärbter Zellen, nur wenige Normalgewebe exprimierten auch stark nukleär.

### **3.2.2.2 Statistische Auswertung**

Zielgrößen bei der Färbung PTOV waren die Färbeintensität (quantitativ) sowie die subzelluläre Verteilung des Markers, untersucht jeweils im Tumor- wie auch im Normalgewebe.

#### ***3.2.2.2.1 Verteilung der Zielgröße Färbeintensität***

Bei der Färbeintensität konnten sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe jegliche Färbeintensitäten (1-3) beobachtet werden. Im Tumorgewebe wurden dabei ein Median von 2 sowie ein Mittelwert von 1,85 bei einer Standardabweichung von 0,64 im Normalgewebe ein Median von 2 sowie ein Mittelwert von 2,11 bei einer Standardabweichung von 0,66 erhoben.

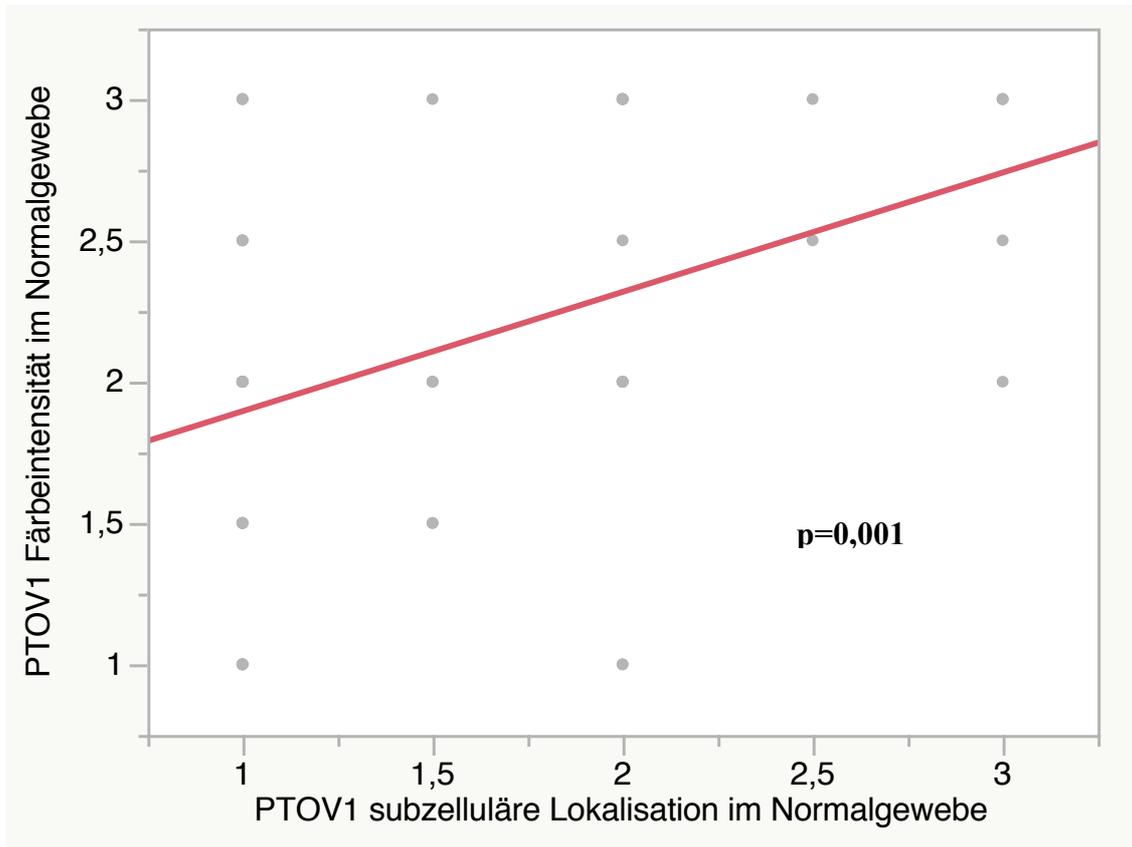
#### ***3.2.2.2.2 Verteilung der Zielgröße der subzellulären Verteilung***

Bezüglich der subzellulären Verteilung zeigte sich sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe eine Verteilung auf alle drei Gruppen der Zielgröße. Im Tumorgewebe ergab sich dabei eine relativ homogene Verteilung über alle Gruppen. Erhoben wurde ein Median von 2 und ein Mittelwert von 2,10 bei einer Standardabweichung von 0,70. Demgegenüber fand sich im Normalgewebe insbesondere eine überwiegend zytoplasmatische und nur wenig kernständige Färbung. Hier ergab sich ein Median von 1 und ein Mittelwert von 1,51 bei einer Standardabweichung von 0,65.

#### ***3.2.2.2.3 Interaktion der beiden Zielgrößen***

Bei Betrachtung der Interaktion der beiden Zielvariablen Färbeintensität und zelluläre Lokalisation in der linearen Regressionsanalyse ließen sich für PTOV1 keine signifikanten Zusammenhänge nachweisen. Eine erhöhte Färbeintensität ging jedoch häufiger mit einer homogen zytoplasmatisch und nukleären Expression einher, während niedrige Färbeintensitäten häufiger bei rein zytoplasmatisch gefärbten Zellen zu finden waren.

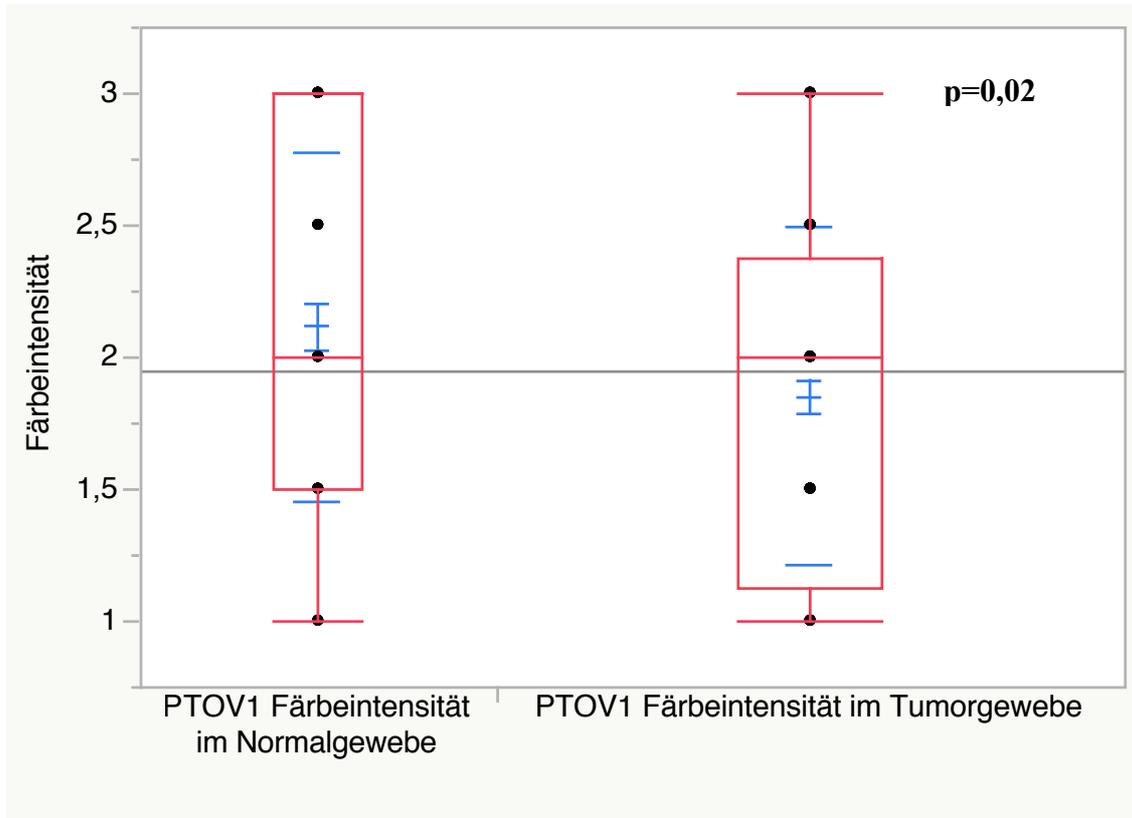
Im Normalgewebe war dieser Einfluss signifikant ( $p=0,001$ ). Auch hier konnte in stärker gefärbten Zellen eher eine Expression in Zytoplasma und Zellkern gefunden werden, schwach gefärbte Zellen zeigten häufiger eine rein zytoplasmatische Färbung (siehe Abb. 16).



**Abb. 16:** Zusammenhang der beiden Zielvariablen (subzelluläre Verteilung vs. Färbeintensität) für XPA-210 im Normalgewebe der Harnblase mittels linearer Regressionsanalyse ( $p=0,001$ ).

#### **3.2.2.2.4 Vergleich der Zielgröße der Färbeintensität in Tumoren und Normalgewebe**

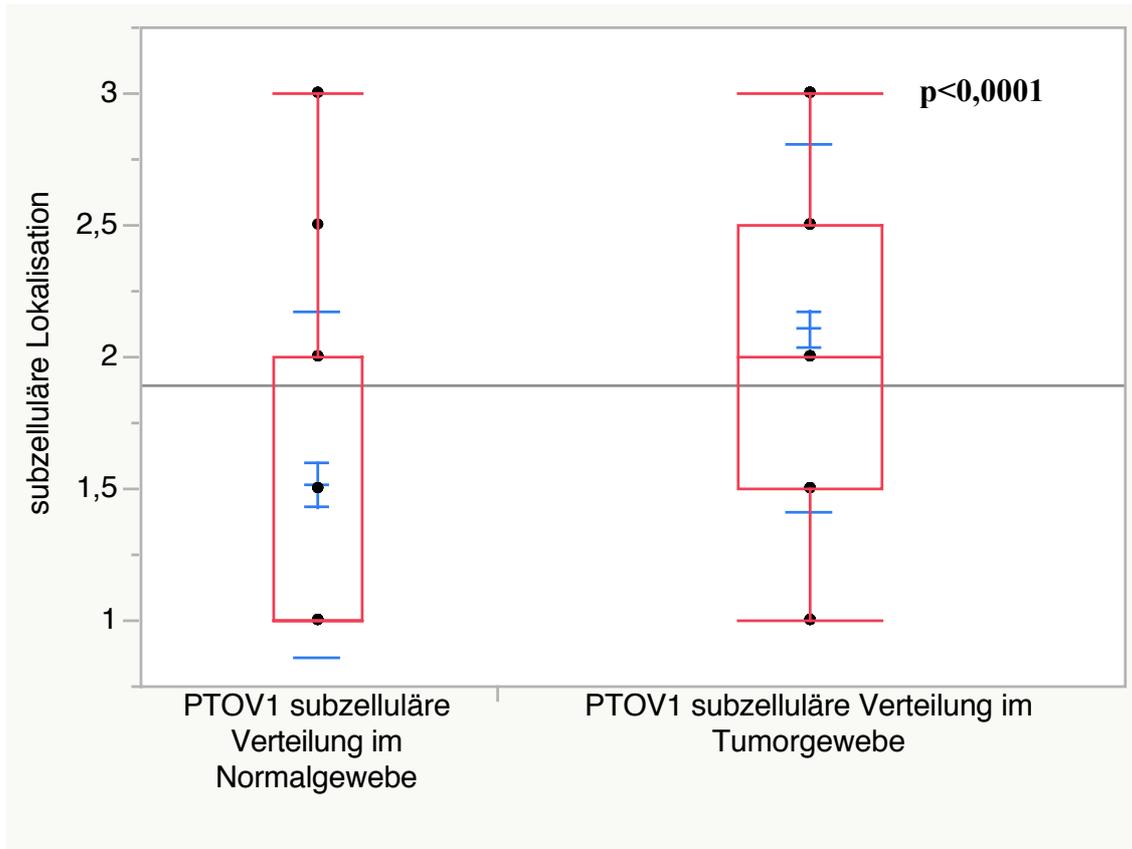
Der Vergleich der Färbeintensität von PTOV1 in Tumor- und Normalgewebe in der einfaktoriellem Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test zeigte mit  $p=0,02$  einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 17). Dabei fand sich im Normalgewebe eine höhere Färbeintensität als im Tumorgewebe.



**Abb. 17:** Vergleich der Expression von PTOV1 in Normal- und Tumorgewebe des Blasenkarzinomes mittels Färbeintensität, einfaktorische Analyse ( $p=0,02$ , Wilcoxon-Test).

### **3.2.2.2.5 Vergleich der Zielgröße der subzellulären Verteilung in Tumoren und Normalgewebe**

Der Vergleich der zellulären Lokalisation von PTOV1 in Tumor- und Normalgewebe in der einfaktorischen Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test zeigte mit  $p<0,0001$  einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 18). Dabei fand sich im Normalgewebe eine vorwiegend cytoplasmatische Expression, im Tumorgewebe neben der zytoplasmatischen auch eine nukleäre Komponente.



**Abb. 18:** Vergleich der Expression von PTOV1 in Normal- und Tumorgewebe des Blasenkarzinomes mittels zellulärer Lokalisation, einfaktorielles Analyse ( $p < 0,0001$ , Wilcoxon-Test).

### 3.3 Korrelationen mit Patientencharakteristika und klinischen Daten

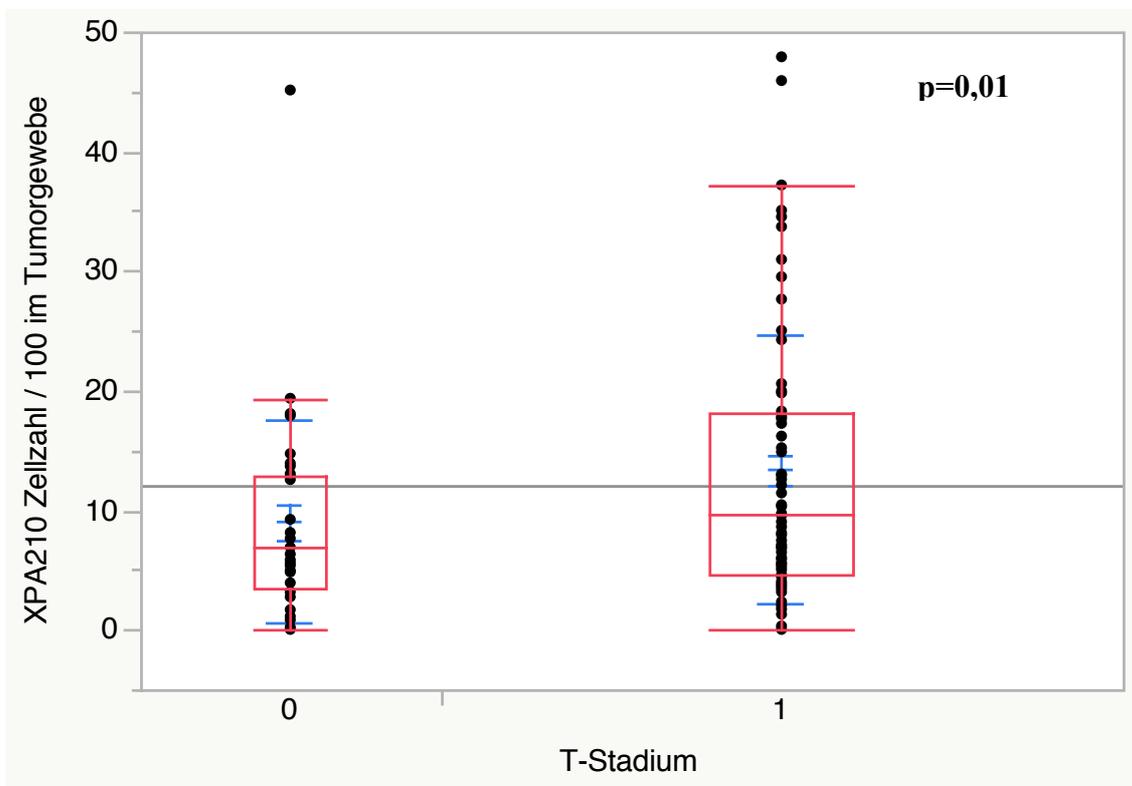
Es folgten univariate Analysen der Zielvariablen hinsichtlich ihres Zusammenhangs zu Patientencharakteristika und klinischen Daten.

#### 3.3.1 Korrelationen von XPA-210

##### 3.3.1.1 T-Stadium

Durch den Vergleich der Zellzahl / 100 Zellen mit dem Tumorstadium T konnten signifikante Zusammenhänge zwischen der Zellzahl und dem Tumorstadium aufgezeigt werden ( $p = 0,01$ ) (siehe Abb. 19). Bei schwächerer Tiefeninfiltration war dabei eine geringere Zahl an Zellen gefärbt, bei den gewebeinvasiveren

Tumoren eine höhere Zahl an Zellen. So konnte das Minimum der Zellzahl mit 0 gefärbten Zellen dem niedrigsten muskelinfiltrierenden Tumorstadium, dem Stadium T2a, zugeordnet werden, das Maximum der gefärbten Zellen mit 48 gefärbten Zellen / 100 Zellen fand sich demgegenüber im höchsten Tumorstadium, dem Stadium T4b. Beim Vergleich der Mediane wie auch der Mittelwerte zeigten sich eine Größenzunahme bis zum Stadium 3b mit einem Median von 14,9 und einem Mittelwert von 15,8 Zellen bei einer Standardabweichung von 12,9 Zellen.



**Abb. 19:** Korrelation der Zielgröße Zellzahl / 100 mit dem T-Stadium für XPA-210 im Tumorgewebe der Harnblase; 0: T=2, 1: T>2; einfaktorische Analyse (p=0,01, Wilcoxon-Test).

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation in den verschiedenen Tumorstadien ließen sich weder bei Betrachtung der einzelnen Infiltrationstiefen noch bei Betrachtung der Subgruppen (T>2/T=2) signifikante Zusammenhänge nachweisen.

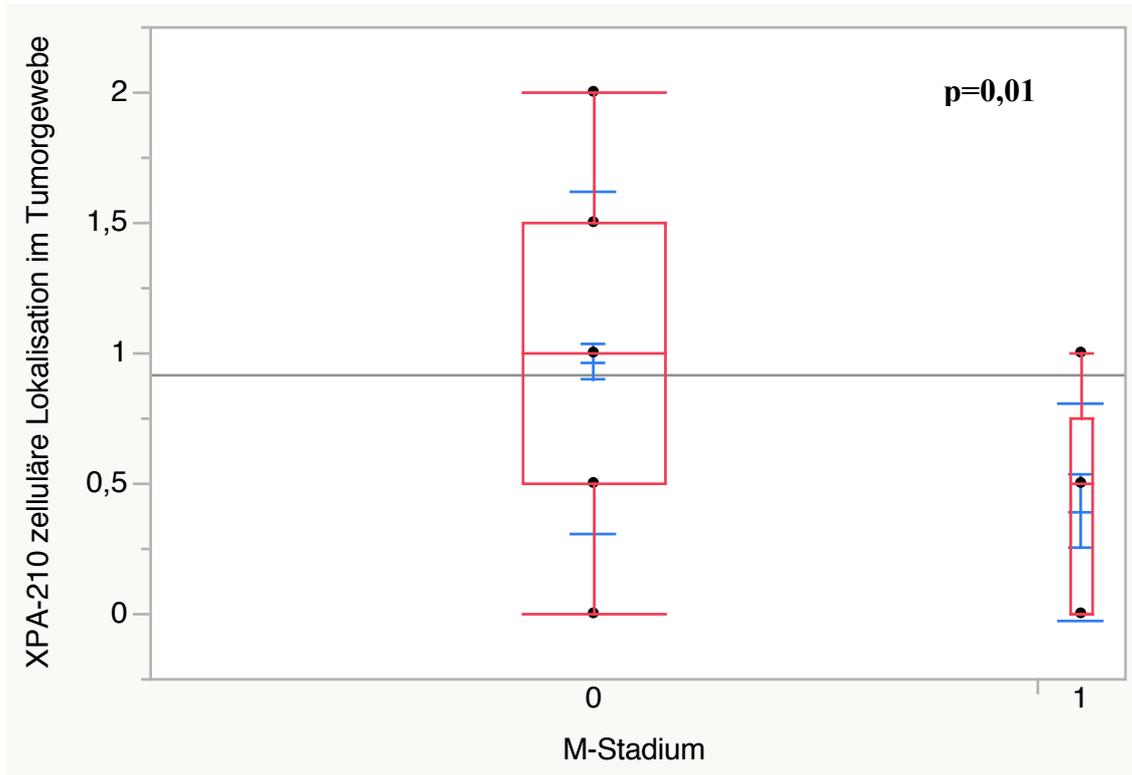
### **3.3.1.2 N-Stadium**

Signifikante Zusammenhänge zum N-Stadium zeigten sich weder bei Betrachtung der Zellzahl noch bei Betrachtung der subzellulären Lokalisation.

Insgesamt war jedoch in einem höheren Tumorstadium eine größere Zellzahl als in einem niedrigen Tumorstadium zu beobachten. So war der höchste Mittelwert mit 14 Zellen wie auch das Maximum der Zellzahl mit 47,9 Zellen in Stadium N2 zu finden, während die geringste Zellzahl dem Stadium N0 zuzuordnen war.

### **3.3.1.3 M-Stadium**

Mit  $p=0,01$  konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der zellulären Lokalisation und dem Ausmaß der Fernmetastasierung hergestellt werden (siehe Abb. 20). Mit einem Median von 1 und einem Mittelwert von 0,96 bei einer Standardabweichung von 0,66 im Stadium M0, sowie einem Median von 0,5 und einem Mittelwert von 0,39 bei einer Standardabweichung von 0,42 im Stadium M1 zeigte sich bei metastasierten Karzinomen eher eine nukleäre, bei nicht metastasierten Karzinomen eine vermehrte zytoplasmatische Komponente.



**Abb. 20:** Korrelation der Zielgröße der subzellulären Lokalisation von XPA-210 mit dem M-Stadium im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinomes, einfaktorielles Analyse ( $p=0,01$ , Wilcoxon-Test).

### 3.3.1.4 Grading

Signifikante Zusammenhänge zum Grading zeigten sich weder bei Betrachtung der Zellzahl noch bei Betrachtung der subzellulären Lokalisation.

### 3.3.1.5 Resektionsausmaß

Auch hinsichtlich des Resektionsausmaßes zeigten sich für keine der beiden Zielvariablen signifikante Zusammenhänge.

### 3.4.1.6 Geschlecht

Ein Zusammenhang zwischen Zellzahl und Geschlecht ließ sich nicht nachweisen. Interessanterweise konnte jedoch mit  $p=0,04$  ein signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und subzellulärer Lokalisation im Tumorgewebe hergestellt werden. Bei Männern zeigte sich eher eine nukleäre

(Mittelwert 0,84, SD 0,65), bei Frauen eine nukleäre Lokalisation mit zytoplasmatischer Komponente (Mittelwert 1,17, SD 0,65).

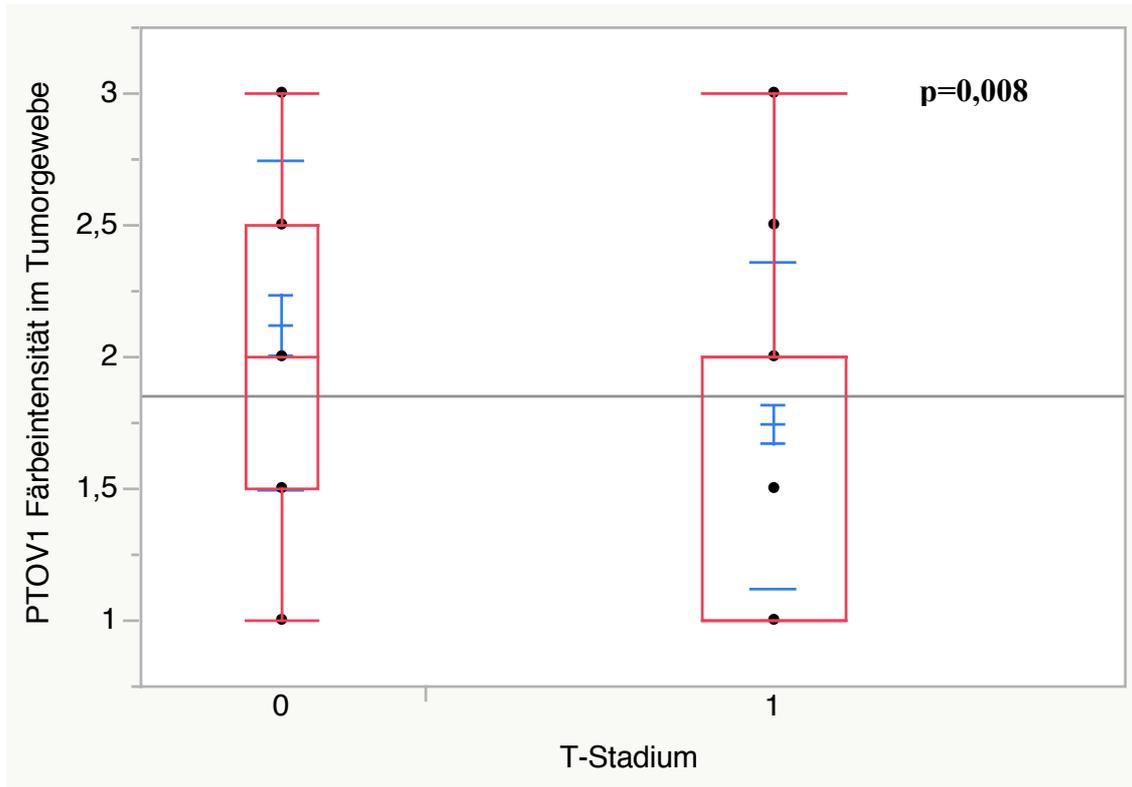
### **3.3.1.7 Alter**

Ein Zusammenhang zwischen Zellzahl und Alter wie auch subzellulärer Lokalisation und Alter ließ sich für das Tumorgewebe nicht nachweisen. Im Normalgewebe fanden sich jedoch interessanterweise sowohl zwischen Zellzahl und Alter ( $p < 0,05$ ) als auch zwischen subzellulärer Lokalisation und Alter ( $p = 0,03$ ) signifikante Zusammenhänge. Bei jüngeren Patienten fand sich dabei eine höhere Zahl an exprimierenden Zellen (Mittelwert 3,6; SD 12,5) sowie eine starke nukleäre Komponente (Mittelwert 0,37; SD 0,59), bei Älteren eine niedrigere Zahl an gefärbten Zellen (Mittelwert 1,1; SD 2,2) mit zusätzlicher zytoplasmatischer Komponente (Mittelwert 0,79; SD 0,64)

## **3.3.2 Korrelationen von PTOV1**

### **3.3.2.1 T-Stadium**

Bei Betrachtung der Subgruppen  $T=2$  und  $T>2$  konnte mit  $p = 0,008$  ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Färbeintensität und der Infiltrationstiefe des Tumors hergestellt werden (siehe Abb. 21). Niedrige Tumorstadien zeigten dabei eine höhere Färbeintensität (Mittelwert 2,1; SD 0,63), höhere Tumorstadien eine geringere Färbeintensität (Mittelwert 1,7; SD 0,62).



**Abb. 21:** Korrelation der Zielgröße der Färbeintensität von PTOV1 mit dem T-Stadium im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinomes, einfaktorische Analyse ( $p=0,008$ , Wilcoxon-Test).

Bei Betrachtung der zellulären Lokalisation fand sich eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation in den oberflächlicheren Tumorstadien sowie eine nahezu homogene Verteilung auf Zytoplasma und Zellkern in höheren Tumorstadien. Signifikante Zusammenhänge fanden sich jedoch nicht. Im Normalgewebe zeigte sich tendenziell eher eine zytoplasmatische Lokalisation.

### 3.3.2.2 N-Stadium

Zwischen den beiden Zielgrößen und dem Lymphknotenstatus ließ sich kein signifikanter Zusammenhang darstellen. Auch hier zeigte sich jedoch eine nachlassende Färbeintensität in den höheren Lymphknotenstadien. Die stärkste zusätzlich-nukleäre Komponente fand sich im Stadium N2. Im Normalgewebe wurde eher eine zytoplasmatische Färbung beobachtet, insbesondere in den Blöcken, die einem niedrigen Lymphknotenstatus im Tumorgewebe zugeordnet

werden konnten. Die Färbeintensität war in den Normalgewebeblöcken durch alle Tumorstadien gehend hoch.

### **3.3.2.3 M-Stadium**

Die Beobachtungen der nachlassenden Färbeintensität in höheren Tumorstadien bestätigten sich auch hinsichtlich des Metastasierungsausmaßes. Ein signifikanter Zusammenhang ließ sich jedoch nicht nachweisen. Zwischen der zellulären Lokalisation und dem Metastasierungsausmaß zeigte sich kein Zusammenhang.

### **3.3.2.4 Grading**

Signifikante Zusammenhänge zwischen den beiden Zielgrößen und dem Grading ließen sich nicht nachweisen. Zu beobachten war jedoch auch hier eine nachlassende Färbeintensität bei höherem Grading.

### **3.3.2.5 Resektionsausmaß**

Signifikante Zusammenhänge zum Resektionsausmaß zeigten sich weder bei Betrachtung der Färbeintensität noch bei Betrachtung der subzellulären Lokalisation.

### **3.3.2.6 Geschlecht**

Zum Geschlecht wurden für keine der beiden Zielvariablen signifikante Zusammenhänge beobachtet.

### **3.3.2.7 Alter**

Signifikante Zusammenhänge zum Alter zeigten sich weder bei Betrachtung der Färbeintensität noch bei Betrachtung der subzellulären Lokalisation.

### **3.4 Korrelationen mit Daten des Krankheitsverlaufes**

#### **3.4.1 Ergebnisse der Follow-up - Erhebungen**

Von 102 der 111 Patienten gelang die Erhebung eines postoperativen Follow-up, wobei das Follow-up lediglich bei 78 der 111 Patienten (entspricht 70,3% der Patienten) vollständig erhoben werden konnte. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 32 Monate bei einem Nachbeobachtungszeitraum zwischen 2 und 184 Monaten.

Patienten, deren Versterben im Zeitraum von zwei Monaten nach Operation lag, gelten als perioperativ verstorben und sind aus der weiteren Auswertung genommen worden. Im Falle von Patienten mit der Konstellation N1/2/3, R1/2 oder M1 zum Zeitpunkt der Operation ist das Auftreten eines Rezidives nicht erhoben worden, da diese Patienten nicht als tumorfrei angesehen werden konnten. Berücksichtigt wurden diese Patienten aber dennoch hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens und des Gesamtüberlebens.

Die Hauptproblematik in der Erhebung des Follow-up, insbesondere bei den 9 Patienten, bei denen keinerlei Werte bezüglich des Follow-up erhoben werden konnten, lag in der Kontaktierung der weiterbetreuenden Ärzte. Bei einigen Patienten war kein Hausarzt oder nachbetreuender Urologe bekannt bzw. die angegebenen Ärzte waren nicht mehr die aktuell behandelnden Ärzte. Zudem lagen auch den weiterbetreuenden Ärzten nicht immer alle für die vollständige Beantwortung des Fragebogens benötigten Informationen vor.

##### **3.4.1.1 Auftreten eines Rezidives**

Für 78 Patienten (=70,3%) lagen Daten bezüglich eines stattgehabten Rezidives im Nachbeobachtungszeitraum vor, wobei die niedrige Zahl aus oben genannten Gründen der Nichtberücksichtigung postoperativ nicht tumorfreier Patienten zustande kommt. Bei 43,6% (n=34) der Patienten fand sich ein Rezidiv, 56,4% (n=44) der Patienten überlebten rezidivfrei. Der Zeitpunkt des Auftretens des Rezidives lag dabei zwischen 2 und 184 Monaten nach Operation mit einem Median von 34,5 Monaten.

### **3.4.1.2 Gesamtüberleben**

Bei 103 der 111 Patienten (=92,8%) lagen Angaben bezüglich des Gesamtüberlebens vor. 58,8% (n=60) der Patienten waren bis zum Zeitpunkt des Endes der Erhebung des Follow-up im August 2013 verstorben, 41,2% (n=43) der betrachteten Patienten lebten noch. Der Zeitraum des Versterbens lag dabei zwischen 3 und 184 Monaten bei einem Median von 32 Monaten.

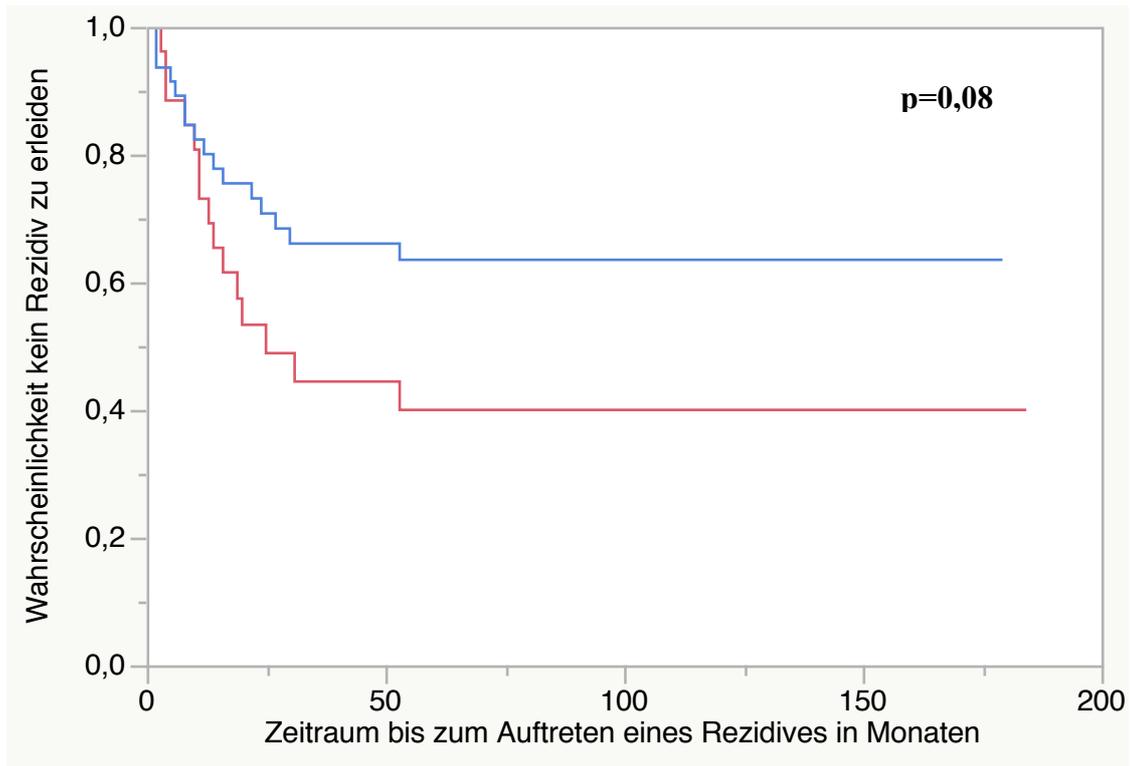
### **3.4.1.3 Tumorspezifisches Überleben**

Bezüglich des tumorspezifischen Überlebens lagen Angaben von 99 der 111 Patienten vor (=89,2%). 48,5% (n=48) der beobachteten Patienten verstarben aufgrund eines Zusammenhangs zum Tumor, 51,5% (n=51) der Patienten verstarben unabhängig von ihrem Tumorleiden. Der Zeitraum des tumorabhängigen Versterbens lag dabei zwischen 3 und 184 Monaten bei einem Median von 32 Monaten.

## **3.4.2 XPA-210**

### **3.4.2.1 Rezidivfreie Zeit nach Zystektomie**

Mit beiden Zielvariablen (Zellzahl / 100 wie auch zelluläre Lokalisation) ließen sich keine signifikanten Beobachtungen hinsichtlich des Zeitpunktes des Auftretens eines Rezidives treffen. Bei Betrachtung der rezidivfreien Zeit in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation, in welcher der Marker exprimiert wurde, zeigte sich jedoch mit  $p=0,08$  ein Trend zur Unterschiedlichkeit (siehe Abb. 22). Dabei trat bei jenen Patienten, bei denen eine vorwiegend nukleäre Lokalisation beobachtet wurde, eher ein Rezidiv auf, als bei solchen mit vermehrter cytoplasmatischer Lokalisation.

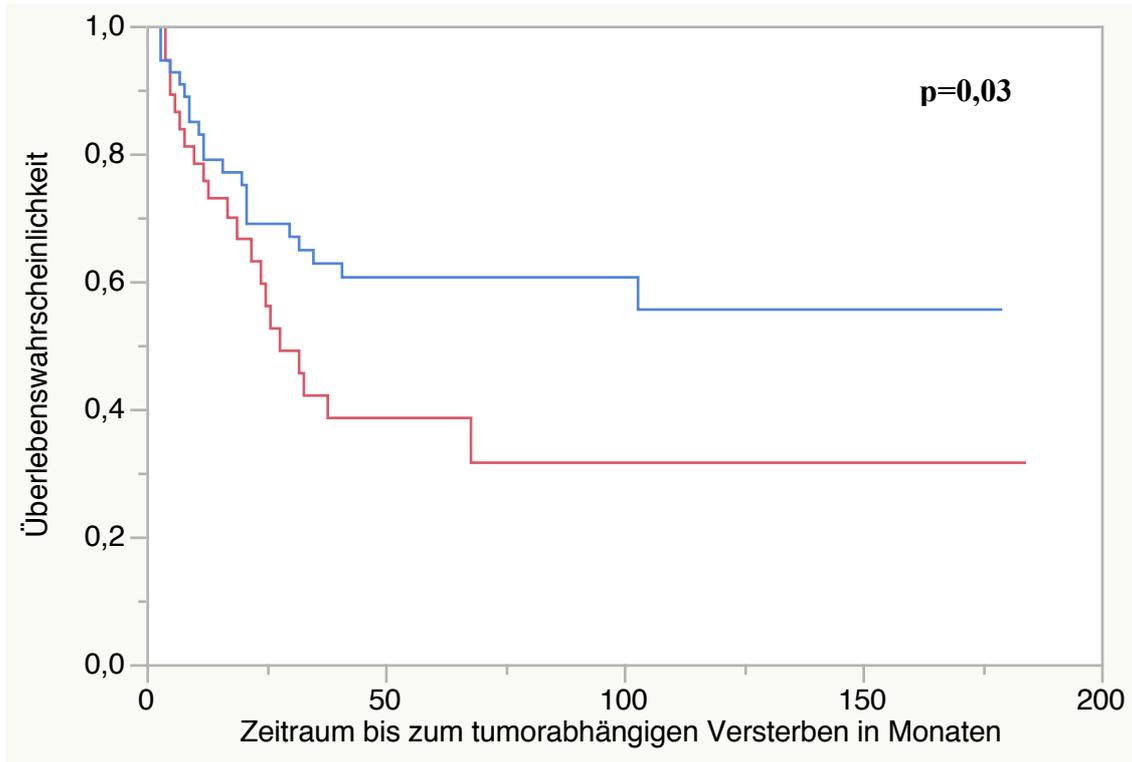


**Abb. 22:** Zeitraum des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation von XPA-210 im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinoms, Kaplan-Mayer-Kurve ( $p=0,08$ ).

- : zelluläre Lokalisation < Median
- : zelluläre Lokalisation  $\geq$  Median

### 3.4.2.2 Tumorspezifisches Überleben

Bei Betrachtung des tumorspezifischen Überlebens in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation von XPA-210 konnte mit  $p=0,03$  ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (siehe Abb. 23). Patienten, die eine vorwiegend nukleäre Lokalisation zeigten, verstarben deutlich häufiger und früher krebsspezifisch als Patienten, bei denen XPA-210 vorwiegend zytoplasmatisch exprimiert wurde.



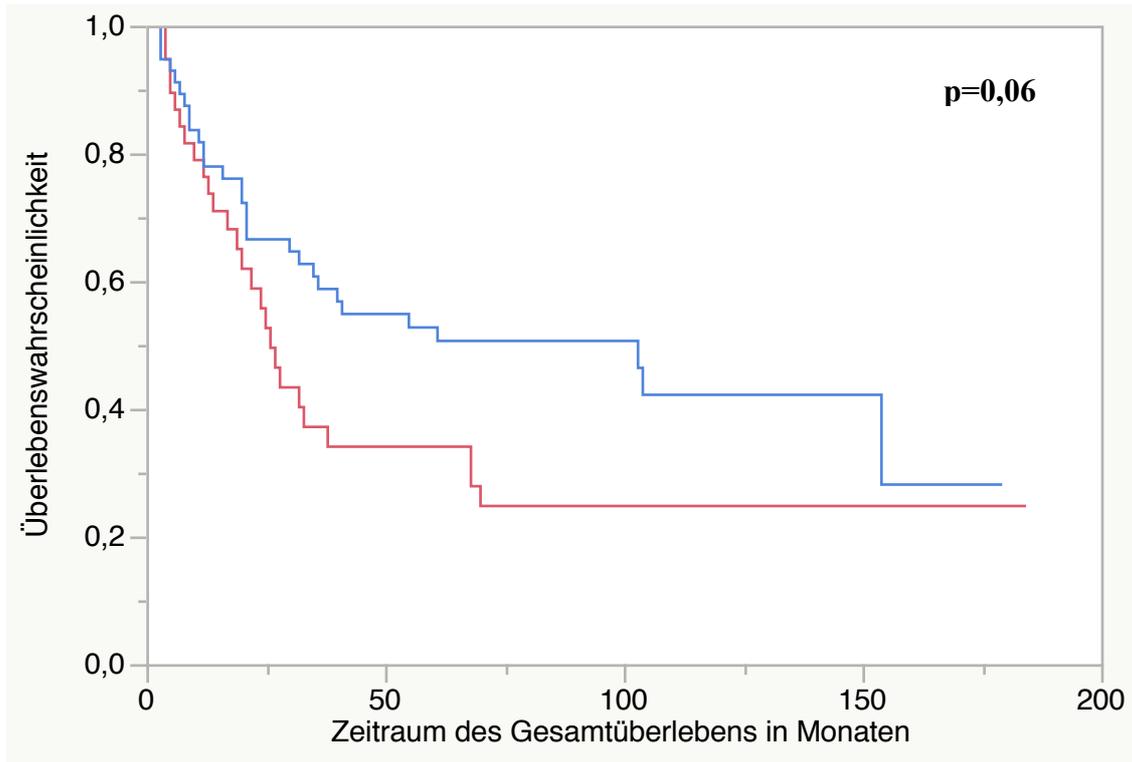
**Abb. 23:** Wahrscheinlichkeit des tumorabhängigen Versterbens in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation von XPA-210 im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinomes, Kaplan-Mayer-Kurve ( $p=0,03$ ).

- : zelluläre Lokalisation < Median
- : zelluläre Lokalisation  $\geq$  Median

Eine Prognose bezüglich des tumorspezifischen Überlebens durch Betrachtung der Zellzahl gelang nicht.

### 3.4.2.3 Gesamtüberleben

Auch hinsichtlich des Gesamtüberlebens konnten keine signifikanten Unterschiede mit Hilfe der beiden untersuchten Parameter nachgewiesen werden. Die Betrachtung des Gesamtüberlebens abhängig von der zellulären Lokalisation zeigte jedoch mit  $p=0,06$  ebenfalls einen Trend zur Unterschiedlichkeit, wobei erneut die nukleäre Lokalisation mit einer schlechteren Prognose einherging (siehe Abb. 24).



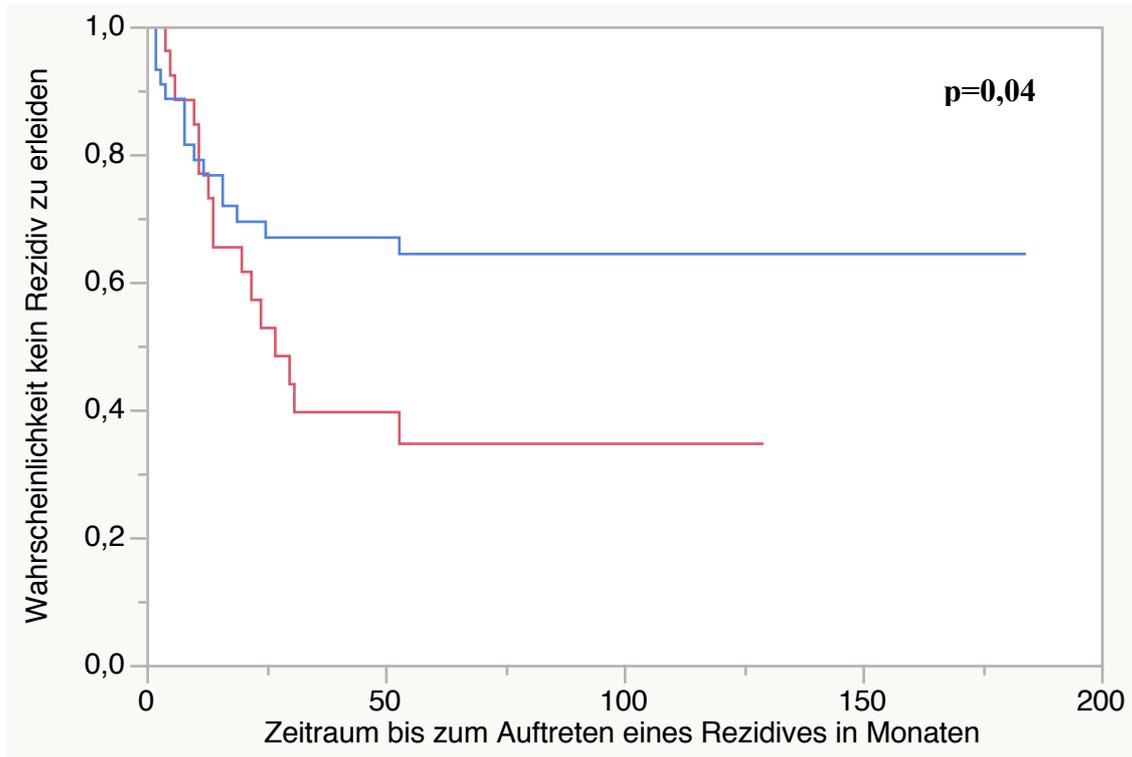
**Abb. 24:** Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der zellulären Lokalisation von XPA-210 im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinoms, Kaplan-Mayer-Kurve ( $p=0,06$ ).

- : zelluläre Lokalisation < Median
- : zelluläre Lokalisation  $\geq$  Median

### 3.4.3 PTOV1

#### 3.4.3.1 Rezidivfreie Zeit nach Zystektomie

Mit Hilfe der Intensität der Expression ließen sich signifikante Unterschiede ( $p=0,04$ ) hinsichtlich der Zeitspanne des Auftretens eines Rezidives nachweisen (siehe Abb. 25). Bei Patienten, die eine schwache Expression zeigten, fand sich eher ein Rezidiv als bei solchen mit einer starken Expression des Markers.



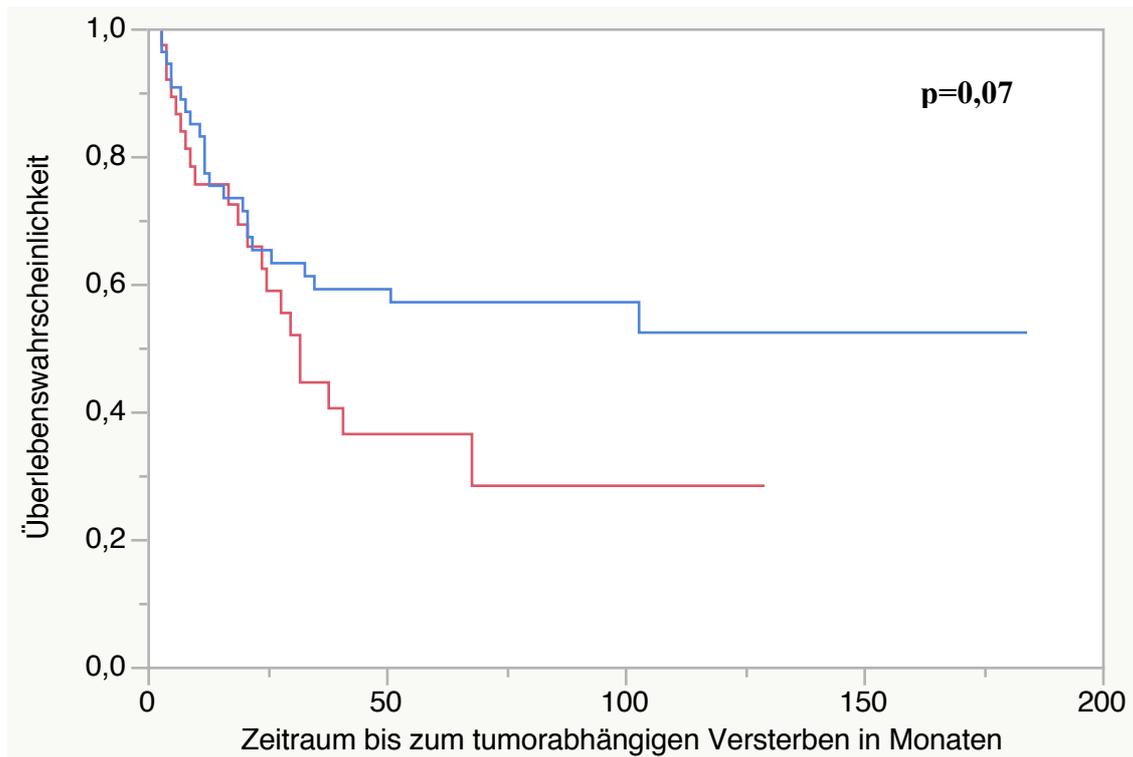
**Abb. 25:** Zeitraum des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Färbeintensität von PTOV1 im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinomes, Kaplan-Mayer-Kurve ( $p=0,04$ ).

- : Intensität < Median
- : Intensität  $\geq$  Median

Hinsichtlich zellulärer Lokalisation und Zeitpunkt des Auftretens des Rezidives ließ sich kein signifikanter Zusammenhang darstellen.

### 3.4.3.2 Tumorspezifisches Überleben

Signifikante Unterschiede hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens ließen sich mit keinem der zwei Parameter nachweisen. Bei Betrachtung der Färbeintensität zeigte sich jedoch eine geringere Überlebensdauer bei schwächerer Expression ( $p=0,07$ ) (siehe Abb. 26).

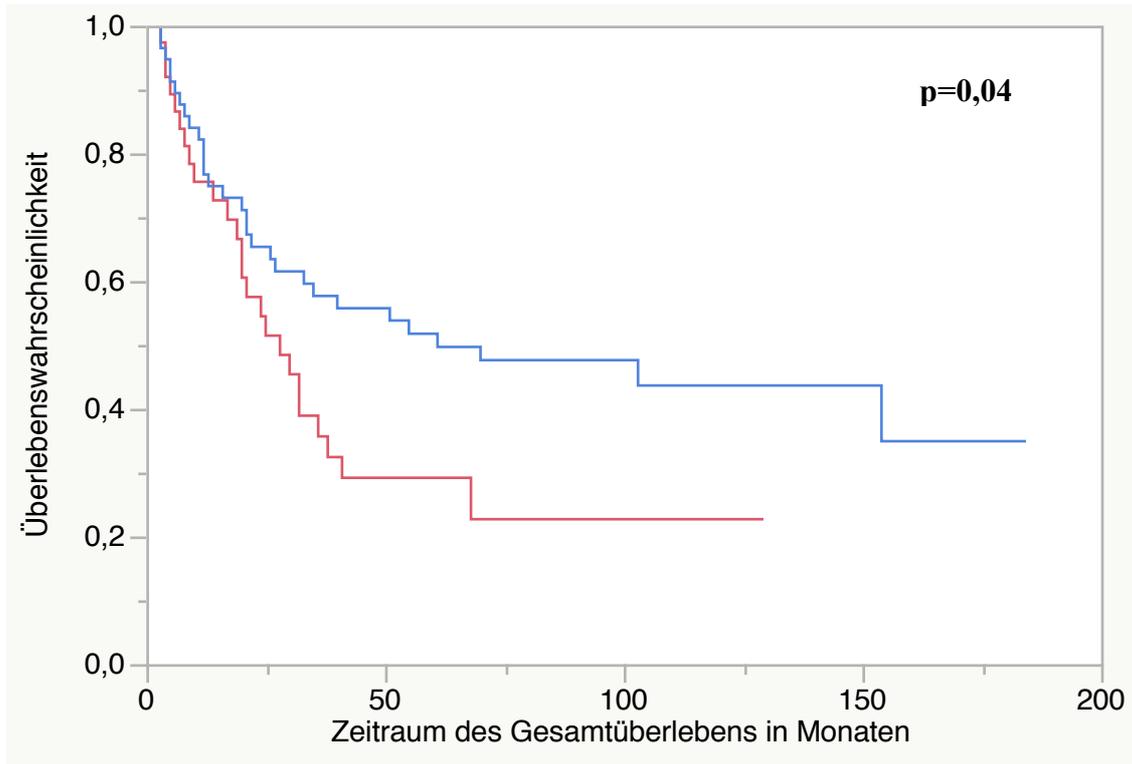


**Abb. 26:** Wahrscheinlichkeit des tumorabhängigen Versterbens in Abhängigkeit von der Färbeintensität von PTOV1 im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinomes, Kaplan-Mayer-Kurve ( $p=0,07$ ).

- 0 : Intensität < Median
- 1 : Intensität  $\geq$  Median

### 3.4.3.3 Gesamtüberleben

Auch bei Betrachtung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Färbeintensität zeigten sich signifikante Zusammenhänge ( $p=0,04$ ). Patienten, bei denen eine schwache Expression zu beobachten war, zeigten eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als solche mit starker Expression (siehe Abb. 27).



**Abb. 27:** Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Färbeintensität von PTOV1 im Tumorgewebe des Harnblasenkarzinomes, Kaplan-Mayer-Kurve ( $p=0,04$ ).

- 0 : Intensität < Median
- 1 : Intensität  $\geq$  Median

Hinsichtlich der zellulären Lokalisation konnte kein signifikanter Zusammenhang zum Gesamtüberleben aufgezeigt werden.

### 3.5 Multivariate Analysen

Bei all jenen Parametern, bei denen mit Hilfe der Expression des Markers Vorhersagen über den Verlauf der Erkrankung getroffen werden konnten, folgten multivariate Analysen, um zu überprüfen, ob der nachgewiesene Effekt auch unabhängig von starken Prädiktoren auftritt.

#### 3.5.1 XPA-210

Initial wurde nachgewiesen, dass mit Hilfe der zellulären Lokalisation von XPA-210 eine Vorhersage hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens getroffen werden kann.

In univariaten Analysen konnten alle Einflussgrößen T, N und R als starke Prädiktoren hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens aufgezeigt werden (T:  $p=0,001$ ; N:  $p=0,04$ , R:  $p=0,003$ ).

In der multivariaten Analyse ließ sich jedoch für keine der genannten Variablen, einschließlich der zellulären Lokalisation von XPA-210, ein unabhängiger signifikanter Einfluss nachweisen (siehe Tab. 7).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
XPA, zell. Lokalisation	1	1	1,56923929	0,2103
N	2	2	1,66440695	0,4351
R	1	1	2,81068615	0,0936
T>2	1	1	2,685772	0,1012

**Tab. 7:** Multivariate Analyse, Prädiktoren hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens (inklusive der zellulären Lokalisation von XPA-210).

### 3.5.2 PTOV1

Bei PTOV1 wurde zuvor für die Färbeintensität ein Einfluss auf das rezidivfreie Überleben wie auch auf das Gesamtüberleben nachgewiesen.

In univariaten Analysen zeigte sich hinsichtlich des Auftretens eines Rezidives insbesondere die Infiltrationstiefe als starker Prädiktor ( $p=0,02$ ). Die Betrachtung von Lymphknotenstatus und Resektionsausmaß zeigte keinen signifikanten Einfluss. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens konnte in univariaten Analysen für alle Variablen ein signifikanter Einfluss (T:  $p=0,001$ , N:  $p=0,03$ , R:  $p=0,003$ ) aufgezeigt werden.

In der multivariaten Analyse zeigte sich die Infiltrationstiefe sowohl hinsichtlich des Auftretens eines Rezidives ( $p=0,04$ ) (siehe Tab. 8) als auch hinsichtlich des Gesamtüberlebens ( $p=0,04$ ) (siehe Tab. 9) als ein unabhängiger signifikanter Einflussfaktor. Die Färbeintensität ließ sich nicht als unabhängiger Prädiktor bestätigen.

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi2
PTOV1, Intensität	1	1	0,57202342	0,4495
N	2	2	2,01248101	0,3656
R	1	1	0,19727719	0,6569
T>2	1	1	4,08664784	0,0432*

**Tab. 8:** Multivariate Analyse, Prädiktoren hinsichtlich des Auftretens eines Rezidives (inklusive der Färbeintensität von PTOV1).

Quelle	Anzahl Parameter	Freiheitsgrade	L-R Chi-Quadrat	Wahrsch. > Chi2
PTOV1, Intensität	1	1	0,82267083	0,3644
N	2	2	5,34223178	0,1484
R	1	1	4,70309749	0,0952
T>2	1	1	4,06903822	0,0437*

**Tab. 9:** Multivariate Analyse, Prädiktoren hinsichtlich des Gesamtüberlebens (inklusive der Färbeintensität von PTOV1).

## **4. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit liefert Daten zu neuen molekularen Markern, die in Zukunft möglicherweise für klinische Fragestellungen in Diagnostik und Therapie des muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinoms herangezogen werden können. Dabei wurde bewusst eine Methode gewählt, die im Sinne eines translationalen Ansatzes bereits in dieser Phase eine mögliche routinemäßige Anwendung unterstützt.

Die ermittelten Daten haben dabei einerseits Beobachtungen aus bereits bestehenden Studien bestätigt, andererseits konnten durch diese Arbeit jedoch auch neue Erkenntnisse gewonnen werden, mit deren Hilfe die molekulare Ebene des Harnblasenkarzinomes besser verstanden und die Lücke zwischen Forschung und Klinik weiter geschlossen werden kann.

### **4.1 Patientenkollektiv**

Das in dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv kann als repräsentativ betrachtet werden.

Mit einem Geschlechterverhältnis von 3,3:1 (m : w) liegt dieses zwischen den von Ferlay et al. ermittelten Werten für Europa und der Untersuchung des Robert Koch-Institutes für Deutschland (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.,2010, Ferlay et al., 2010).

Das mediane Alter bei Operation lag mit 68 Jahren fünf Jahre unter dem vom Robert Koch-Institut ermittelten Alter der Erstmanifestation (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.,2010). Diese Differenz ist dadurch zu erklären, dass in dieser Arbeit nur Patienten berücksichtigt wurden, die eine radikale Zystektomie erhalten haben. Insbesondere bei älteren Patienten mit eventuellen Komorbiditäten wurde entsprechend des Nutzen-Risiko-Verhältnisses eventuell eine weniger invasive Maßnahme ergriffen, weshalb diese Patienten nicht in dieses Kollektiv einfließen. Nichtsdestotrotz zeigte sich auch hier das Harnblasenkarzinom als das Karzinom des älteren Menschen. Vereinzelt tritt das Harnblasenkarzinom

jedoch immer wieder auch in jungem Alter auf (Telli et al., 2014), was sich in der großen Altersspanne von 32-84 Jahren ausdrückt.

Bei 38,3% der Patienten fand sich zum Zeitpunkt der Operation eine Lymphknotenbeteiligung, etwas häufiger als in der Literatur mit 25% beschrieben (Wang et al., 2014). Bei 8,3% der Patienten fanden sich Fernmetastasen, wie es auch bei anderen Kollektiven zuvor beobachtet wurde (Metts et al., 2000).

## ***4.2 Kritischer Vergleich der Ergebnisse mit bisherigen Studien***

### **4.2.1 Kritischer Vergleich von XPA-210**

Der erste der zwei in dieser Arbeit untersuchten molekularen Marker war das Protein XPA-210. XPA-210 ist ein spezifisches Epitop der Thymidinkinase 1, einem wichtigen Enzym des DNA-Stoffwechsels, welches als Proliferationsmarker verwendet werden kann (Larsson, 2007). Durch eine spezifischere Bindung von Antigenen an dieses Epitop und geringere Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen eignet sich XPA-210 insbesondere für immunhistochemische Untersuchungen und ist deshalb in dieser Arbeit anstelle der TK1 verwendet worden.

Untersucht wurde dabei die Expression des Proteins im Gewebe des muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinomes. Dabei wurden als Zielgrößen die Anzahl der gefärbten Zellen / 100 Zellen sowie die zelluläre Lokalisation des Markers definiert.

In der folgenden Diskussion werden die Ergebnisse dieser Studie insbesondere vergleichend zu den Arbeiten von Zhang et al. und Mizutani et al. dargestellt (Mizutani et al., 2002, Zhang et al., 2006), zwei Arbeiten, die die TK1 in Bezug auf das Harnblasenkarzinom erforscht haben. Zhang et al. untersuchten dabei die Serumkonzentration der TK1 vergleichend bei gesunden Patienten wie auch bei Patienten mit einem Harnblasenkarzinom und zeigten erstmals auch den Nutzen der TK1 als prognostischem Marker mittels Vergleich der

Serumkonzentrationen prä- und postoperativ (Zhang et al., 2006). Die Arbeit von Mizutani et al. ist insofern für diese Arbeit von Belang, als dass ebenfalls die Enzymaktivität im Gewebe untersucht wurde (Mizutani et al., 2002).

Dies ist jedoch die erste Arbeit, die anstelle der TK1 das Epitop XPA-210 im Gewebe des Harnblasenkarzinomes untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass XPA-210 eine erhöhte Expression im Tumorgewebe verglichen zum Normalgewebe aufweist ( $p < 0,001$ ) und somit in der Lage ist, zwischen Tumor- und Normalgewebe zu unterscheiden.

Dies unterstützt die Ergebnisse vorheriger Untersuchungen. Insbesondere die beiden hinsichtlich des Harnblasenkarzinomes vorliegenden Studien zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression im Tumorgewebe und niedrigere Expressionen im Normalgewebe (Mizutani et al., 2002, Zhang et al., 2006). Auch bei anderen Tumorentitäten wie dem Prostatakarzinom (Aufderklamm et al., 2011) oder dem Nierenzellkarzinom (Kruck et al., 2011) ließ sich dieser Zusammenhang aufzeigen.

Mit Hilfe der Zellzahl / 100 gefärbter Zellen ließ sich in dieser Arbeit zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von XPA-210 und dem Tumorstaging darstellen. Ein höheres T-Stadium zeigte dabei signifikant höhere Werte als ein niedriges ( $p = 0,01$ ), wie auch zuvor von Mizutani et al. (Mizutani et al., 2002) sowie Zhang et al. (Zhang et al., 2006) gezeigt wurde.

Auch bei Betrachtung des Lymphknotenbefalles und des Ausmaßes der Metastasierung fand sich häufiger eine Expression von XPA-210, wobei der Nachweis signifikanter Zusammenhänge hier nicht gelang.

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Untersuchung einer Korrelation zwischen XPA-210 und dem Tumorgrading, da die einzigen beiden bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten zum Harnblasenkarzinom hier unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen. Es gelang jedoch in dieser Arbeit, wie auch bei Zhang et al. (Zhang et al., 2006), nicht, einen Zusammenhang zum Grading herzustellen.

Dies ist darauf zurückzuführen, dass lediglich muskelfiltrierende Harnblasenkarzinome untersucht wurden, die jeweils ein hohes Grading (G2 / G3) aufwiesen. G1-Tumoren waren in dieser Studie nicht vertreten. In der Studie, in der Mizutani et al. (Mizutani et al., 2002) einen Zusammenhang zwischen TK1-Aktivität und Grading nachweisen konnten, waren auch Ta- und T1-Tumore integriert, sodass hier ein Vergleich zwischen wenig- und hochdifferenzierten Tumoren möglich war. Eine vergleichende Untersuchung von XPA-210 auch im oberflächlichen Harnblasenkarzinom ist für die Zukunft geplant.

Hinsichtlich der zellulären Verteilung zeigte sich sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Färbung. Im Normalgewebe überwog dabei die nukleäre Komponente, im Tumorgewebe war neben der nukleären auch häufig eine zytoplasmatische Komponente zu erkennen.

Der Nachweis der vermehrten zytoplasmatischen Komponente im Tumorgewebe wurde so auch bei anderen Tumorentitäten wie dem Prostata- und Nierenzellkarzinom beobachtet (Aufderklamm et al., 2011, Kruck et al., 2011, Luo et al., 2010). Neu in dieser Arbeit ist jedoch die Beobachtung einer unterschiedlichen Lokalisation abhängig von der Dignität. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein Shift/Wechsel von XPA-210 zwischen den zellulären Kompartimenten beim Übergang vom Normalgewebe zum Tumorgewebe. So kann angenommen werden, dass XPA-210 beim Übergang in ein Proliferationsstadium aus dem Zellkern in das Zytoplasma verdrängt wird. Dies ist so z.B. auch beim Mamma-Carzinom für p27 beobachtet worden (Blain und Massague, 2002). Eine vermehrte zytoplasmatische Komponente korreliert dort mit einer hohen Tumoraggressivität und schlechten Überlebensraten, während p27 im gesunden Gewebe nukleär exprimiert wird.

Auch bei kombinierter Betrachtung der beiden Zielvariablen ließen sich signifikante Zusammenhänge nachweisen ( $p > 0,0001$ ). So ging eine hohe Anzahl gefärbter Zellen häufig mit einer zytoplasmatischen Komponente einher, während bei Expression in nur wenigen Zellen vorwiegend nukleär exprimiert

wurde. Dies bekräftigt noch einmal die Aussagekraft der beiden Marker insbesondere in Bezug auf die Differenzierungsmöglichkeit zwischen Tumor- und Normalgewebe.

Demgegenüber steht jedoch die Beobachtung einer vermehrt nukleären Komponente bei Auftreten von Fernmetastasen. Somit korreliert hier das nukleäre Vorkommen, was ansonsten vermehrt im Normalgewebe beobachtet wurde, mit einem vermeintlich schwereren Krankheitsstadium. Ergänzende Studien zum Aufklären dieses Widerspruches sind somit notwendig, zumal dies die erste Arbeit ist, die die Expression von XPA-210 beim Harnblasenkarzinom histologisch und in Bezug auf die subzelluläre Verteilung untersucht. Auch die oben genannten Studien, die die TK1-Aktivität im Harnblasenkarzinom untersuchten, bezogen sich dabei nicht auf die subzelluläre Verteilung des untersuchten Markers.

Ein weiteres wichtiges Ziel war die Untersuchung von XPA-210 hinsichtlich des Einsatzes als möglichem prädiktiven Marker. Dies gelang für die Zielvariable der zellulären Lokalisation. So zeigten sich zwischen der zellulären Lokalisation und dem tumorspezifischen Überleben signifikante Zusammenhänge ( $p=0,03$ ), wenngleich eine Bestätigung als unabhängiger Prädiktor in der multivariaten Analyse nicht gelang.

Auch hinsichtlich des Rezidivrisikos und des Gesamtüberlebens fanden sich deutliche, wenn auch keine signifikanten Zusammenhänge.

Entgegen den oben gemachten Aussagen einer vermehrt cytoplasmatischen Expression im Tumorgewebe korrelierte hier jedoch erneut eine verstärkte nukleäre Komponente mit einer schlechteren Prognose.

Diese Arbeit ergänzt somit die Untersuchungen von Zhang et al., die erstmals die Serumkonzentrationen von TK1 prä- und postoperativ untersuchten und erhöhte Serumkonzentrationen bei schlechtem Outcome nachweisen konnten. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um die oben genannten Widersprüche aufzuklären.

#### 4.2.2 Kritischer Vergleich von PTOV1

Der zweite in dieser Arbeit untersuchte Marker war PTOV1. PTOV1 wurde bislang vor allem hinsichtlich seiner Bedeutung als molekularer Marker beim Prostatakarzinom untersucht. Hier zeigen sich vielversprechende Ergebnisse. So kann PTOV1 beim Prostatakarzinom zwischen Tumor- und Normalgewebe unterscheiden und zeigt steigende Expressionen von der PIN ausgehend hin zum Karzinom (Benedict et al., 2001).

Lediglich eine Studie liegt vor, welche die PTOV1-Expression, neben anderen Tumorentitäten, auch am Harnblasenkarzinom untersucht hat (Fernandez et al., 2011). Mit einer Fallzahl von 11 Patienten, die unter einem Harnblasenkarzinom litten, ist hier jedoch nur ein sehr kleines Patientenkollektiv untersucht worden. Dies zeigt den Stellenwert dieser Arbeit, die erstmals PTOV1 an einer großen Fallzahl von Patienten mit muskelinfiltrierendem Harnblasenkarzinom untersucht.

Kürzlich veröffentlichte Studien am Ovarialkarzinom (Guo et al., 2015), bei Brustkrebs (Lei et al., 2014) sowie beim hepatozellulären Karzinom (Chen et al., 2015) zeigen die Aktualität des Markers.

Als Untersuchungsparameter wurden in dieser Arbeit die Färbeintensität wie auch die zelluläre Verteilung von PTOV1 im Gewebe betrachtet.

Während der Großteil der bisherigen Studien die zelluläre Lokalisation lediglich als deskriptive Komponente gebraucht, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die zelluläre Verteilung als Einflussgröße betrachtet und erstmals anhand einer großen Fallzahl untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang mit Hilfe von PTOV1 eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe sowohl durch Betrachtung der Färbeintensität ( $p=0,01$ ) als auch bei Betrachtung der zellulären Lokalisation ( $p<0,0001$ ).

Im Tumorgewebe zeigte sich dabei eine schwächere Färbeintensität sowie eine zunehmend nukleäre Lokalisation, im Normalgewebe fand sich eine stärkere Färbeintensität sowie eine vermehrte zytoplasmatische Komponente.

Somit bestätigt diese Arbeit die oben genannten bisherigen Studien, was die Aussagekraft von PTOV1 hinsichtlich der Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe betrifft.

Hinsichtlich der zellulären Lokalisation von PTOV1 wurden in bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen divergente Beobachtungen gemacht. So wird teilweise eine überwiegend cytoplasmatische Komponente beschrieben (Mazzucchelli et al., 2011), teils eine cytoplasmatische Komponente mit stärkster Expression in unmittelbarer Nähe zum Zellkern (Benedict et al., 2001), häufig jedoch, wie auch in der von Fernandez et al. zweiten das Harnblasenkarzinom betreffenden Arbeit, eine vermehrt nukleäre Komponente (Fernandez et al., 2011, Morote et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde eine überwiegend cytoplasmatische Expression beobachtet, die sich jedoch mit Progression zum Tumorgewebe in das nukleäre Kompartiment verschiebt.

Bereits in vorherigen Studien ist gezeigt worden, dass PTOV1 das Kompartiment wechselt und somit ein Shift vom Zytoplasma ausgehend in Richtung Zellkern stattfindet (Santamaria et al., 2003). PTOV1 bewirkt dabei den Eintritt der Zelle in die Synthese-Phase des Zellzyklus, was die Assoziation zu einer erhöhten nukleären Lokalisation in proliferierendem Tumorgewebe, wie in dieser Arbeit beobachtet, erklärt.

Auffällig ist, dass in dieser Arbeit die Färbeintensität im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen bezüglich PTOV1 im Tumorgewebe geringer als im Normalgewebe war.

Eine mögliche Erklärung für die abnehmende Färbeintensität im Tumorgewebe, die in dieser Arbeit beobachtet wurde, könnte an der Betrachtungsweise der homogenen Zelle liegen. Begutachtet wurde die Färbeintensität der gesamten Zelle, also gleichzeitig von Zytoplasma und Zellkern. Wurde wie in höheren Tumorstadien eine Verteilung auf Zytoplasma und Zellkern beobachtet, war die Färbeintensität insgesamt betrachtet niedriger als im Normalgewebe, wo vermehrt im Zytoplasma, dafür aber dort sehr stark exprimiert wurde. In diesem

Zusammenhang ist erneut der Shift zwischen Zytoplasma und Zellkern zu erwähnen. Zur Verifizierung der Beobachtungen sollte eine Studie mit getrennter Beobachtung der Färbeintensität im Zellkern wie auch im Zytoplasma folgen.

Bei der Korrelation von PTOV1 mit klinischen Daten zeigten sich signifikant auffällige Werte bei Betrachtung der Färbeintensität in Bezug auf die Tumordinfiltration ( $p=0,008$ ). So zeigten hohe Tumorstadien eine niedrigere Expression und niedrige Tumorstadien eine hohe Expression des Markers. Diese Tendenzen ließen sich zudem auch hinsichtlich des Lymphknotenstatus, des Metastasierungsmaßes und des Grading beobachten, jedoch nicht signifikant nachweisen. Erneut wäre ein Vergleich mit oberflächlichen Tumoren sinnvoll, um diese Beobachtungen zu untermauern

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in den kürzlich veröffentlichten Studien zum Ovarial-Carcinom (Guo et al., 2015), bei Brustkrebs (Lei et al., 2014) und beim hepatozellulären Karzinom (Chen et al., 2015) gemacht. Auch hier konnten in unterschiedlichem Ausmaß signifikante Einflüsse auf das Staging nachgewiesen werden. Die hier vorliegende Arbeit ist jedoch die erste Arbeit, bei der dies auch für das Harnblasenkarzinom gelang.

Eine Assoziation zum Grading konnte, wie zuvor bei Fernandez et al., allerdings nicht bestätigt werden, was jedoch dadurch erklärbar ist, dass in der hier vorliegenden Arbeit lediglich High-Grade Tumoren mit einem Stadium  $G \geq 2$  beobachtet wurden.

Hinsichtlich eines potentiellen Einsatzes von PTOV1 als prädiktivem Marker gelang es mit Hilfe der Färbeintensität signifikante Zusammenhänge aufzuzeigen. So geht eine niedrigere Färbeintensität mit einem größeren Rezidivrisiko ( $p=0,04$ ) und einer schlechteren Überlebensrate einher ( $p=0,04$ ). Auch hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens zeigten sich mit  $p=0,07$  Auffälligkeiten.

Es gibt bislang nur wenige Studien, die sich mit dem Einsatz von PTOV1 als möglichem prädiktivem Marker beschäftigen. Beim Prostatakarzinom wurde eine

erhöhte Expression bei den Krebsvorstufen beobachtet, aus denen sich später ein Karzinom entwickelte (Benedict et al., 2001). Beim Ovarialkarzinom zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die 5-Jahres-Überlebensrate (Guo et al., 2015). Auch beim Mammakarzinom ging der Nachweis von PTOV1 mit einer schlechteren Überlebensrate einher, wobei auch hier kontroverse Ergebnisse in verschiedenen Tumorstadien beobachtet wurden (Lei et al., 2014).

Diese Arbeit ist die erste Arbeit, bei der der Nutzen von PTOV1 als prädiktivem Marker für den Verlauf des Harnblasenkarzinomes nachgewiesen werden konnte. Es gelang jedoch leider nicht, PTOV1 auch in multivariaten Analysen als unabhängigen Prädiktor darzustellen, weshalb ergänzende Untersuchungen dringend notwendig sind.

### ***4.3 Klinische Bedeutung und möglicher Einsatz der Marker***

Ziel dieser Arbeit war es insbesondere auch, die klinische Bedeutung der Marker hinsichtlich der primären Diagnostik aber auch hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Prozedere herauszuarbeiten.

Dies gelang für beide Marker.

Das Harnblasenkarzinom wird im klinischen Alltag in Bezug auf den Schweregrad der Erkrankung bislang einzig anhand der TNM-Klassifikation der UICC kategorisiert. Dennoch haben diese Patienten bei gleicher Klassifikation einen ganz unterschiedlichen Krankheitsverlauf, was zeigt, dass weitere Faktoren das Risikoprofil eines Patienten bestimmen. Mögliche prognosebestimmende Faktoren könnten dabei die XPA-210-, wie auch die PTOV1-Expression sein.

Mit Kenntnis des individuellen Verhaltens eines Patienten bezüglich der Expression der untersuchten Marker kann anschließend spezifisch auf diesen eingegangen und ein persönliches Diagnose- und Therapieregime erarbeitet werden.

### **4.3.1 Klinische Bedeutung von XPA-210**

Für XPA-210 wurde gezeigt, dass es signifikant häufiger im Tumor- als im Normalgewebe exprimiert wird. Dies verdeutlicht die Rolle dieses Markers als diagnostisches Hilfsmittel, insbesondere in der histopathologischen Begutachtung. Eine starke Expression geht zudem mit einem hohen Tumorstadium einher und ermöglicht so eine unterstützende Aussage in Bezug auf den Schweregrad der Erkrankung. So kann, wie oben erläutert, für XPA-210- positive Patienten ein aggressiveres Therapieregime notwendig sein.

Hinsichtlich des Nutzens als Proliferationsmarker ergänzt XPA-210 den bereits etablierten Marker Ki-67. Ki-67 wird vorwiegend nukleär exprimiert, mit XPA-210 ist mit der zytoplasmatischen Expression somit ein zweites Kompartiment betroffen, was noch genauere Ergebnisse ermöglicht (Larsson, 2007).

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der immunhistochemischen Betrachtung von XPA-210. Hierfür sind jedoch Gewebeproben der Patienten notwendig, die in aller Regel invasiv gewonnen werden müssen. Weitere Studien sind notwendig, um eine zukünftige Nutzung von XPA-210 als Serum- oder Urinmarker zu ermöglichen und somit eine weniger-invasive Diagnosemöglichkeit zu schaffen. Erste Untersuchungen der TK1 zeigten hier bereits vielversprechende Ansätze, u.a. auch als Screeninguntersuchungen. So konnten bei Patienten mit erhöhter TK-Serumkonzentration vermehrt Tumoren entdeckt, insbesondere aber krebsassoziierte Erkrankungen beobachtet werden (Chen et al., 2008).

Für den Einsatz von XPA-210 als prognostischen Marker ist insbesondere auf die subzelluläre Lokalisation zu achten. Eine starke nukleäre Lokalisation korreliert signifikant mit dem häufigeren Auftreten von Fernmetastasen ( $p=0,01$ ). Somit könnte in Erwägung gezogen werden, Patienten mit starker nukleärer Expression engmaschiger zu screenen, um mögliche Fernmetastasen frühzeitig zu erkennen. Die nukleäre Lokalisation korreliert zudem mit einem höheren Rezidivrisiko und einer geringeren Überlebensrate sowie signifikant mit

dem tumorspezifischen Überleben. Eine Anpassung der Therapie in Bezug auf (Hoch-)Risikogruppen ist somit ebenfalls zu erwägen.

### **4.3.2 Klinische Bedeutung von PTOV1**

Auch PTOV1 ist beim Harnblasenkarzinom in der Lage, zwischen Tumor- und Normalgewebe zu unterscheiden und somit als Marker in der Diagnostik des Harnblasenkarzinomes einzusetzen. Die Korrelation zwischen Expression und Tumorstadium ermöglicht auch hier Aussagen hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung. So ist über eine Anpassung der Therapieschemata mit einer intensivierten Therapie bei Auffälligkeiten in der PTOV-1-Färbung nachzudenken.

Auch als prognostischer Marker ist PTOV1 einzusetzen. Bei nachlassender Expression ist das Rezidivrisiko erhöht, das Gesamtüberleben erniedrigt. So ist zu überlegen, diese Patienten enghemmaschiger zu screenen, um ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen oder auch hier die Therapie an das Risikoprofil anzupassen.

## **4.4 Limitierende Faktoren**

Kritisch betrachtet gibt es einige beeinflussende Faktoren, die diese Arbeit limitieren.

Die Größe des Kollektivs mit 111 betrachteten Patienten kann als Limitierung gesehen werden. Es ist geplant, diese Studie später an einem größeren Kollektiv zu bestätigen.

Als Untersuchungsmethoden wurden überwiegend semiquantitative Verfahren gewählt. Diese sind stark untersucherabhängig, weshalb geplant ist, die Ergebnisse mit objektiveren Methoden zu validieren.

Die in dieser Arbeit untersuchten Normalgewebe sind aus Tumorgewebeblöcken entnommen worden, was sicherlich das Ergebnis beeinflussen kann. Es ist jedoch zu erwarten, dass bei Normalgewebe, welches

bei nicht von Tumor betroffenen Patienten entnommen wird, noch deutlichere Unterschiede aufzuzeigen sind.

Einen Zusammenhang zwischen der Expression der Marker und dem Grading nachzuweisen misslang, da in dieser Arbeit ausschließlich muskelfiltrierende Tumoren mit hohem Grading verwendet wurden. G1-Tumore wurden nicht untersucht, was die Aussagekraft limitiert. Ziel wäre, in einer weiterführenden Studie oberflächliche und muskelfiltrierende Harnblasenkarzinome zu vergleichen und somit ein breiteres Spektrum an Tumorgewebe zu untersuchen. Dies könnte zudem die in dieser Studie beobachteten Tendenzen der Korrelation zwischen der Expression der Marker und dem weiteren Staging inklusive Lymphknoten- und Metastasierungsstadium bekräftigen.

#### **4.5 Schlussfolgerungen**

Sowohl XPA-210 als auch PTOV1 zeigen sich als potentiell mögliche Marker für die Diagnostik des Harnblasenkarzinomes. Sie ermöglichen einerseits zwischen Tumor- und Normalgewebe zu differenzieren, andererseits konnten signifikante Zusammenhänge zu Parametern des Staging, insbesondere zum T-Stadium, aufgezeigt werden.

Es ergaben sich zudem Hinweise, dass die beiden Marker darüberhinaus auch als prognostische Marker einzusetzen sind. Sowohl für XPA-210 als auch für PTOV1 ergaben sich signifikante Zusammenhänge mit den Verlaufsdaten des Follow-up.

Die vorliegende Arbeit ist dabei die erste Arbeit, die für PTOV1 Zusammenhänge zu Parametern des Stagings aufzeigen konnte und ist gleichzeitig die erste Studie, die die XPA-210 - Aktivität im Harnblasenkarzinom per Tissue Microarray und mithilfe einer größeren Fallzahl untersucht.

Es sind allerdings weitere Untersuchungen zur Validierung der oben genannten Beobachtungen notwendig. Die betrachteten Marker können aber als vielversprechend für die Diagnostik und einen möglichen Verlauf des Harnblasenkarzinomes angesehen werden.

## 5. Zusammenfassung

Sowohl in der Diagnostik als auch in der Behandlung des Harnblasenkarzinoms sind noch Problemfelder zu bearbeiten. So sind die in der Diagnostik zur Verfügung stehenden molekularen Marker nach wie vor limitiert und nicht immer eindeutig aussagekräftig. Das Harnblasenkarzinom ist durch seine Unterschiedlichkeit im klinischen Verlauf gekennzeichnet, dabei stehen nur wenige prädiktive molekulare Parameter zur Verfügung. Mit XPA-210 und PTOV1 sind zwei neue molekulare Marker beschrieben, die durch ihre Eigenschaft als Proliferationsmarker eine potentielle Bedeutung für die Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinomes haben könnten. Ziel der vorliegenden Arbeit war, an einem charakterisierten Kollektiv die klinische Bedeutung der beiden Marker zu evaluieren.

An einem Kollektiv von 111 Patienten, die sich in der Klinik für Urologie in Tübingen einer Zystektomie unterzogen haben, wurde mittels der Tissue Microarray-Technik Tumorgewebe und Urothelgewebe der Harnblase immunhistochemisch auf die Expression und zelluläre Lokalisation der beiden Marker untersucht und diese den klinischen Daten und dem individuellen Krankheitsverlauf gegenübergestellt.

Es ergab sich für XPA-210 eine deutlich häufigere Expression im Harnblasenkarzinom im Vergleich zum normalen Urothelgewebe ( $p < 0,001$ ) bei einer vermehrten zytoplasmatischen Expression ( $p = 0,003$ ). Signifikante Korrelationen bestanden dabei zwischen der Expression und dem T-Stadium ( $p = 0,01$ ) sowie der zellulären Lokalisation und dem M-Stadium ( $p = 0,01$ ). Während XPA-210 keine Einflüsse auf das rezidivfreie Überleben wie auch das Gesamtüberleben zeigen konnte, war das tumorspezifische Überleben von Patienten mit stärkerer Expression im Zellkern deutlich reduziert.

Im Fall von PTOV1 ergab sich im Tumorgewebe eine erniedrigte Färbeintensität im Vergleich zum Normalgewebe ( $p = 0,02$ ) bei einer vermehrten nukleären Expression ( $p < 0,0001$ ). Signifikante Zusammenhänge ergaben sich dabei zwischen Expression und dem T-Stadium ( $p = 0,008$ ). Prognostisch zeigten sich sowohl Korrelationen zum rezidivfreien Überleben ( $p = 0,04$ ) als auch zum

Gesamtüberleben ( $p=0,04$ ). Eine schwächere Expression war dabei mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert.

Somit weisen die ermittelten Daten darauf hin, dass sowohl XPA-210 als auch PTOV1 die Diagnostik des Harnblasenkarzinomes unterstützen und eine potentielle Bedeutung für die Prognostik des Harnblasenkarzinomes erlangen könnten. Der physiologische Hintergrund und damit ein potentieller therapeutischer Ansatz müssen weiterhin aufgeklärt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Abol-Enein, H. (2008). "Infection: is it a cause of bladder cancer?" Scand J Urol Nephrol Suppl(218): 79-84.

Aufderklamm, S., Hennenlotter, J., Todenhoefer, T., Gakis, G., Schilling, D., Vogel, U., Kuehs, U., Dlugosch, J., Knapp, J., Merseburger, A., Gerber, V., Ordelleide, A., Hevler, J., Stenzl, A. and Schwentner, C. (2011). "XPA-210: a new proliferation marker determines locally advanced prostate cancer and is a predictor of biochemical recurrence." World J Urol.

Baris, D., Karagas, M. R., Verrill, C., Johnson, A., Andrew, A. S., Marsit, C. J., Schwenn, M., Colt, J. S., Cherala, S., Samanic, C., Waddell, R., Cantor, K. P., Schned, A., Rothman, N., Lubin, J., Fraumeni, J. F., Jr., Hoover, R. N., Kelsey, K. T. and Silverman, D. T. (2009). "A case-control study of smoking and bladder cancer risk: emergent patterns over time." J Natl Cancer Inst **101**(22): 1553-1561.

Bassi, P., Ferrante, G. D., Piazza, N., Spinadin, R., Carando, R., Pappagallo, G. and Pagano, F. (1999). "Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort." J Urol **161**(5): 1494-1497.

Bastacky, S., Ibrahim, S., Wilczynski, S. P. and Murphy, W. M. (1999). "The accuracy of urinary cytology in daily practice." Cancer **87**(3): 118-128.

BeecherInstruments, Inc. (1998). "Manual Tissue Arrayer MTA-1, Instruction Manual."

Benedit, P., Paciucci, R., Thomson, T. M., Valeri, M., Nadal, M., Caceres, C., de Torres, I., Estivill, X., Lozano, J. J., Morote, J. and Reventos, J. (2001). "PTOV1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks." Oncogene **20**(12): 1455-1464.

Blain, S. W. and Massague, J. (2002). "Breast cancer banishes p27 from nucleus." Nat Med **8**(10): 1076-1078.

Bosetti, C., Rosato, V., Gallus, S. and La Vecchia, C. (2012). "Aspirin and urologic cancer risk: an update." Nat Rev Urol.

Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., Lopez-Abente, G., Tzonou, A., Chang-Claude, J., Bolm-Audorff, U., Jockel, K. H., Donato, F., Serra, C., Wahrendorf, J., Hours, M., T'Mannetje, A., Kogevinas, M. and Boffetta, P. (2000). "Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies." Int J Cancer **86**(2): 289-294.

Chen, S. P., Zhang, L. S., Fu, B. S., Zeng, X. C., Yi, H. M. and Jiang, N. (2015). "Prostate tumor overexpressed 1 is a novel prognostic marker for hepatocellular

carcinoma progression and overall patient survival." Medicine (Baltimore) **94**(4): e423.

Chen, Z., Zhou, H., Li, S., He, E., Hu, J., Zhou, J. and Skog, S. (2008). "Serological thymidine kinase 1 (STK1) indicates an elevated risk for the development of malignant tumours." Anticancer Res **28**(6B): 3897-3907.

Chrouser, K., Leibovich, B., Bergstralh, E., Zincke, H. and Blute, M. (2005). "Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer." J Urol **174**(1): 107-110; discussion 110-101.

Cole, C. J., Pollack, A., Zagars, G. K., Dinney, C. P., Swanson, D. A. and von Eschenbach, A. C. (1995). "Local control of muscle-invasive bladder cancer: preoperative radiotherapy and cystectomy versus cystectomy alone." Int J Radiat Oncol Biol Phys **32**(2): 331-340.

Coons, A. H. (1971). "The development of immunohistochemistry." Ann N Y Acad Sci **177**: 5-9.

Coons, A. H., H. H. Creech & R.N. Jones (1941). "Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group." Proc. Soc. Exp. Biol. Med(47): 200-202.

Coons, A. H. and Kaplan, M. H. (1950). "Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody." J Exp Med **91**(1): 1-13.

Cox, David (1972). "Regression models and life tables." Journal of the Royal Statistical Society B(34): 187-220.

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2006) "Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2006." Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2010) "Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends." Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2013) "Krebs in Deutschland 2009/2010." Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 9. Ausgabe.

Elsevier, S. M., Kucherlapati, R. S., Nichols, E. A., Creagan, R. P., Giles, R. E., Ruddle, F. H., Willecke, K. and McDougall, J. K. (1974). "Assignment of the gene for galactokinase to human chromosome 17 and its regional localisation to band q21-22." Nature **251**(5476): 633-636.

Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K. and Eklund, H. (2002). "Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases." Cell Mol Life Sci **59**(8): 1327-1346.

Ferlay, J., Parkin, D. M. and Steliarova-Foucher, E. (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." Eur J Cancer **46**(4): 765-781.

Fernandez, S., Mosquera, J. L., Alana, L., Sanchez-Pla, A., Morote, J., Ramon, Y. Cajal S., Reventos, J., de Torres, I. and Paciucci, R. (2011). "PTOV1 is overexpressed in human high-grade malignant tumors." Virchows Arch **458**(3): 323-330.

Gakis, G., Hennenlotter, J., Scharpf, M., Hevler, J., Schilling, D., Kuehs, U., Stenzl, A. and Schwentner, C. (2011). "XPA-210: a new proliferation marker to characterize tumor biology and progression of renal cell carcinoma." World J Urol **29**(6): 801-806.

Gakis, G., Schwentner, C., Todenhoefer, T. and Stenzl, A. (2012). "Current status of molecular markers for prognostication and outcome in invasive bladder cancer." BJU Int.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. and Stein, H. (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." J Immunol **133**(4): 1710-1715.

Giltneane, J. M. and Rimm, D. L. (2004). "Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology." Nat Clin Pract Oncol **1**(2): 104-111.

Gronowitz, J. S., Hagberg, H., Kallander, C. F. and Simonsson, B. (1983). "The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma." Br J Cancer **47**(4): 487-495.

Gronowitz, J. S., Steinholtz, L., Kallander, C. F., Hagberg, H. and Bergh, J. (1986). "Serum deoxythymidine kinase in small cell carcinoma of the lung. Relation to clinical features, prognosis, and other biochemical markers." Cancer **58**(1): 111-118.

Grube, D. (2004). "Constants and variables in immunohistochemistry." Arch Histol Cytol **67**(2): 115-134.

Gschwend, J. E., Dahm, P. and Fair, W. R. (2002). "Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy." Eur Urol **41**(4): 440-448.

Guo, F., Feng, L., Hu, J. L., Wang, M. L., Luo, P., Zhong, X. M. and Deng, A. M. (2015). "Increased PTOV1 expression is related to poor prognosis in epithelial ovarian cancer." Tumour Biol **36**(1): 453-458.

Habuchi, T., Marberger, M., Droller, M. J., Hemstreet, G. P., 3rd, Grossman, H. B., Schalken, J. A., Schmitz-Drager, B. J., Murphy, W. M., Bono, A. V., Goebell, P., Getzenberg, R. H., Hautmann, S. H., Messing, E., Fradet, Y. and Lokeshwar, V. B. (2005). "Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers." Urology **66**(6 Suppl 1): 64-74.

Hallek, M., Emmerich, B., Strohmeyer, S., Busch, R., Reichle, A. and Senekowitsch, R. (1988). "Activity of serum thymidine kinase in non-Hodgkin lymphoma: relationship to other prognostic factors." Klin Wochenschr **66**(16): 718-723.

Halling, K. C. (2003). "Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma." Expert Rev Mol Diagn **3**(4): 507-519.

Hannigan, B. M., Barnett, Y. A., Armstrong, D. B., McKelvey-Martin, V. J. and McKenna, P. G. (1993). "Thymidine kinases: the enzymes and their clinical usefulness." Cancer Biother **8**(3): 189-197.

Hautmann, R. E., Volkmer, B. G., Schumacher, M. C., Gschwend, J. E. and Studer, U. E. (2006). "Long-term results of standard procedures in urology: the ileal neobladder." World J Urol **24**(3): 305-314.

He, Q., Mao, Y., Wu, J., Decker, C., Merza, M., Wang, N., Eriksson, S., Castro, J. and Skog, S. (2004). "Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumour marker for breast carcinomas." Int J Oncol **25**(4): 945-953.

He, Q., Skog, S., Wang, N., Eriksson, S. and Tribukait, B. (1996). "Characterization of a peptide antibody against a C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine kinase, which is a marker for cell proliferation." Eur J Cell Biol **70**(2): 117-124.

He, Q., Zhang, P., Zou, L., Li, H., Wang, X., Zhou, S., Fornander, T. and Skog, S. (2005). "Concentration of thymidine kinase 1 in serum (S-TK1) is a more sensitive proliferation marker in human solid tumors than its activity." Oncol Rep **14**(4): 1013-1019.

Helmert, F.R. (1876). Zeitschrift fuer Math. und Physik(21): 102-219.

IARC (France 1986). "IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Tobacco Smoking." WHO Lyon.

Kaplan, E.L; Meier, Paul (1958). "Nonparametric Estimation from Incomplete Observations." Journal of the American Statistical Association **53**(282): 457-481.

Ke, P. Y. and Chang, Z. F. (2004). "Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway." Mol Cell Biol **24**(2): 514-526.

Kemik, O., Kemik, A. S., Purisa, S. and Tuzun, S. (2011). "Serum thymidine kinase is associated with gastric adenocarcinoma." Bratisl Lek Listy **112**(9): 510-511.

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G. and Kallioniemi, O. P. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med **4**(7): 844-847.

Kruck, S., Hennenlotter, J., Vogel, U., Schilling, D., Gakis, G., Hevler, J., Kuehs, U., Stenzl, A. and Schwentner, C. (2011). "Exposed proliferation antigen 210 (XPA-210) in renal cell carcinoma (RCC) and oncocytoma: clinical utility and biological implications." BJU Int.

Kruskal, W.H.; Wallis, W.A. (1952). "Use of ranks in one-criterion variance analysis." Journal of the American Statistical Association **47**: 583-621.

Larsson, U. A.; A. Wanders, N. Wang, B. Tribukait (2007). XPA-210 - a new, universal, cytoplasmatic cell proliferation marker for immunohistochemistry. Department of Pathology, Uppsala University Hospital, Uppsalla, Sweden, Department of Oncology and Pathology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Lei, F., Zhang, L., Li, X., Lin, X., Wu, S., Li, F. and Liu, J. (2014). "Overexpression of prostate tumor overexpressed 1 correlates with tumor progression and predicts poor prognosis in breast cancer." BMC Cancer **14**: 457.

Lokeshwar, V. B., Habuchi, T., Grossman, H. B., Murphy, W. M., Hautmann, S. H., Hemstreet, G. P., 3rd, Bono, A. V., Getzenberg, R. H., Goebell, P., Schmitz-Drager, B. J., Schalken, J. A., Fradet, Y., Marberger, M., Messing, E. and Droller, M. J. (2005). "Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers." Urology **66**(6 Suppl 1): 35-63.

Look, K. Y., Moore, D. H., Sutton, G. P., Prajda, N., Abonyi, M. and Weber, G. (1997). "Increased thymidine kinase and thymidylate synthase activities in human epithelial ovarian carcinoma." Anticancer Res **17**(4A): 2353-2356.

Lotan, Y., Bagrodia, A., Passoni, N., Rachakonda, V., Kapur, P., Arriaga, Y., Bolenz, C., Margulis, V., Raj, G. V., Sagalowsky, A. I. and Shariat, S. F. (2013). "Prospective Evaluation of a Molecular Marker Panel for Prediction of Recurrence and Cancer-specific Survival After Radical Cystectomy." Eur Urol.

Luo, P., Wang, N., He, E., Eriksson, S., Zhou, J., Hu, G., Zhang, J. and Skog, S. (2010). "The proliferation marker thymidine kinase 1 level is high in normal

kidney tubule cells compared to other normal and malignant renal cells." Pathol Oncol Res **16**(2): 277-283.

Mallofre, C., Castillo, M., Morente, V. and Sole, M. (2003). "Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia." Mod Pathol **16**(3): 187-191.

Mantel, Nathan (1966). "Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration." Cancer Chemotherapy Reports **50**(3): 163-170.

Mao, Y., Wu, J., Skog, S., Eriksson, S., Zhao, Y., Zhou, J. and He, Q. (2005). "Expression of cell proliferating genes in patients with non-small cell lung cancer by immunohistochemistry and cDNA profiling." Oncol Rep **13**(5): 837-846.

Mazzucchelli, R., Barbisan, F., Santinelli, A., Lopez-Beltran, A., Cheng, L., Scarpelli, M. and Montironi, R. (2011). "Immunohistochemical expression of prostate tumor overexpressed 1 in cystoprostatectomies with incidental and insignificant prostate cancer. Further evidence for field effect in prostatic carcinogenesis." Hum Pathol **42**(12): 1931-1936.

Mazzucchelli, R., Scarpelli, M., Barbisan, F., Santinelli, A., Lopez-Beltran, A., Cheng, L. and Montironi, R. (2013). "Immunohistochemical expression of prostate tumour overexpressed 1 (PTOV1) in atypical adenomatous hyperplasia (AAH) of the prostate: additional evidence linking (AAH) to adenocarcinoma." Cell Oncol (Dordr) **36**(1): 37-42.

Metts, M. C., Metts, J. C., Milito, S. J. and Thomas, C. R., Jr. (2000). "Bladder cancer: a review of diagnosis and management." J Natl Med Assoc **92**(6): 285-294.

Miller, D. C., Taub, D. A., Dunn, R. L., Montie, J. E. and Wei, J. T. (2003). "The impact of co-morbid disease on cancer control and survival following radical cystectomy." J Urol **169**(1): 105-109.

Mizutani, Y., Wada, H., Yoshida, O., Fukushima, M., Kamoi, K. and Miki, T. (2002). "Prognostic significance of thymidine kinase activity in bladder carcinoma." Cancer **95**(10): 2120-2125.

Morote, J., Fernandez, S., Alana, L., Iglesias, C., Planas, J., Reventos, J., Ramon, Y. Cajal S., Paciucci, R. and de Torres, I. M. (2008). "PTOV1 expression predicts prostate cancer in men with isolated high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsy." Clin Cancer Res **14**(9): 2617-2622.

Mostafa, M. H., Sheweita, S. A. and O'Connor, P. J. (1999). "Relationship between schistosomiasis and bladder cancer." Clin Microbiol Rev **12**(1): 97-111.

Petty, E. M., Miller, D. E., Grant, A. L., Collins, E. E., Glover, T. W. and Law, D. J. (1996). "FISH localization of the soluble thymidine kinase gene (TK1) to

human 17q25, a region of chromosomal loss in sporadic breast tumors." Cytogenet Cell Genet **72**(4): 319-321.

Poley, S., Stieber, P., Nussler, V., Pahl, H. and Fateh-Moghadam, A. (1997). "Serum thymidine kinase in non-Hodgkin lymphomas with special regard to multiple myeloma." Anticancer Res **17**(4B): 3025-3029.

Roche (2003). Lexikon Medizin, Urban und Fischer. **5**.

Romeis (2010). "Mikroskopische Technik." (18. Auflage): 200.

Sanchez-Carbayo, M. (2003). "Use of high-throughput DNA microarrays to identify biomarkers for bladder cancer." Clin Chem **49**(1): 23-31.

Sanguedolce, F., Bufo, P., Carrieri, G. and Cormio, L. (2014). "Predictive markers in bladder cancer: Do we have molecular markers ready for clinical use?" Crit Rev Clin Lab Sci **51**(5): 291-304.

Santamaria, A., Fernandez, P. L., Farre, X., Benedit, P., Reventos, J., Morote, J., Paciucci, R. and Thomson, T. M. (2003). "PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle." Am J Pathol **162**(3): 897-905.

Shelley, M. D., Court, J. B., Kynaston, H., Wilt, T. J., Coles, B. and Mason, M. (2003). "Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for Ta and T1 bladder cancer." Cochrane Database Syst Rev(3): Cd003231.

Sherley, J. L. and Kelly, T. J. (1988). "Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle." J Biol Chem **263**(17): 8350-8358.

Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R., Ross, R. K. and Yu, M. C. (2003). "Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(6): 503-507.

Stein, J. P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A. C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D. and Skinner, D. G. (2001). "Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients." J Clin Oncol **19**(3): 666-675.

Stein, J. P. and Skinner, D. G. (2006). "Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure." World J Urol **24**(3): 296-304.

Steinmaus, C. M., Nunez, S. and Smith, A. H. (2000). "Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables." Am J Epidemiol **151**(7): 693-702.

Stenzl, A., Cowan, N. C., De Santis, M., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Ribal, M. J., Sherif, A. and Witjes, J. A. (2011). "Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines." Eur Urol.

Svobodova, S., Topolcan, O., Holubec, L., Treska, V., Sutnar, A., Rupert, K., Kormunda, S., Rousarova, M. and Finek, J. (2007). "Prognostic importance of thymidine kinase in colorectal and breast cancer." Anticancer Res **27**(4A): 1907-1909.

Tan, P. H., Bay, B. H., Yip, G., Selvarajan, S., Tan, P., Wu, J., Lee, C. H. and Li, K. B. (2005). "Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death." Mod Pathol **18**(3): 374-381.

Telli, O., Sarici, H., Ozgur, B. C., Doluoglu, O. G., Sunay, M. M., Bozkurt, S. and Eroglu, M. (2014). "Urothelial cancer of bladder in young versus older adults: clinical and pathological characteristics and outcomes." Kaohsiung J Med Sci **30**(9): 466-470.

Tetu, B. (2009). "Diagnosis of urothelial carcinoma from urine." Mod Pathol **22 Suppl 2**: S53-59.

Todenhofer, T., Hennenlotter, J., Esser, M., Mohrhardt, S., Tews, V., Aufderklamm, S., Gakis, G., Kuehs, U., Stenzl, A. and Schwentner, C. (2013). "Combined application of cytology and molecular urine markers to improve the detection of urothelial carcinoma." Cancer Cytopathol **121**(5): 252-260.

Tritschler, S., Strittmatter, F., Karl, A. and Stief, C. (2013). "[Urine marker systems for diagnosis of urothelial cancer.]." Urologe A.

Verheijen, R., Kuijpers, H. J., van Driel, R., Beck, J. L., van Dierendonck, J. H., Brakenhoff, G. J. and Ramaekers, F. C. (1989). "Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes." J Cell Sci **92 ( Pt 4)**: 531-540.

Wang, L., Mudaliar, K., Mehta, V., Barkan, G. A., Quek, M. L., Flanigan, R. C. and Picken, M. M. (2014). "Seeking a standard for adequate pathologic lymph node staging in primary bladder carcinoma." Virchows Arch **464**(5): 595-602.

Warren, W., Biggs, P. J., el-Baz, M., Ghoneim, M. A., Stratton, M. R. and Venitt, S. (1995). "Mutations in the p53 gene in schistosomal bladder cancer: a study of 92 tumours from Egyptian patients and a comparison between mutational spectra from schistosomal and non-schistosomal urothelial tumours." Carcinogenesis **16**(5): 1181-1189.

Widmark, A., Flodgren, P., Damber, J. E., Hellsten, S. and Cavallin-Stahl, E. (2003). "A systematic overview of radiation therapy effects in urinary bladder cancer." Acta Oncol **42**(5-6): 567-581.

Willecke, K., Teber, T., Kucherlapati, R. S. and Ruddle, F. H. (1977). "Human mitochondrial thymidine kinase is coded for by a gene on chromosome 16 of the nucleus." Somatic Cell Genet **3**(3): 237-245.

Witjes, J. A., Comperat, E., Cowan, N. C., De Santis, M., Gakis, G., Lebet, T., Ribal, M. J., Van der Heijden, A. G. and Sherif, A. (2014). "EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines." Eur Urol **65**(4): 778-792.

Zhang, J., Jia, Q., Zou, S., Zhang, P., Zhang, X., Skog, S., Luo, P., Zhang, W. and He, Q. (2006). "Thymidine kinase 1: a proliferation marker for determining prognosis and monitoring the surgical outcome of primary bladder carcinoma patients." Oncol Rep **15**(2): 455-461.

---

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stenzl, dem Ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik der Universität Tübingen sowie Herrn Prof. Dr. Schwenter, als betreuendem Doktorvater, für die Bereitstellung des interessanten Themas und der für die Durchführung der Arbeit benötigten Hilfsmittel.

Ein besonderer Dank gilt Jörg Hennenlotter, dem Betreuer dieser Arbeit. Vielen Dank für die immer offene Tür des Labors und die Zeit, die Sie sich stets genommen haben, sowohl für ausgemachte, aber auch unangemeldete Termine - vielfach spontan für fünf Minuten zwischen zwei Vorlesungen. Danke für die fachlichen Ratschläge und die konstruktive Kritik sowohl bei der Durchführung der Versuche wie auch im Anschluss beim Verfassen der Dissertationsschrift. Auch die vielen Gespräche abseits des eigentlichen Themas haben mir stets neue Erkenntnisse gebracht.

Danken möchte ich auch den weiteren Mitgliedern im Team des urologischen Labors. Hier sind besonders Frau Ursula Kühs für die Hilfe beim Erstellen der immunhistochemischen Färbungen und Julian Heinkele für die Hilfe beim Erstellen des Tissue Microarrays zu erwähnen.

Danke an Dr. Tilman Todenhöfer für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Danke an Dr. Marcus Scharpf aus der Pathologie für die Hilfe beim Auswerten der pathologischen Präparate.

Für die gute Zusammenarbeit und manch einen gemeinsam im Labor verbrachten Tag möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Teresa Bischoff und Mauro Semilia bedanken.

Der größte Dank aber gilt meiner Familie und meinen Freunden. Danke für das immer offene Ohr und die Unterstützung, wenn die Arbeit einmal stagnierte und danke für die Ablenkung und den Zuspruch immer dann, wenn ich es brauchte.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Katharina Teepe

Geburtsdatum: 06.02.1987

Geburtsort: Münster (Westf.)

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung:

1993-1997 Katholische Grundschule Everswinkel

1997-2006 Mariengymnasium Warendorf  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/2003-04/2004 Auslandsjahr, Jahrgangsstufe 11, Stoke Damerel  
Community College, Plymouth, England

### Studium:

10/2006-03/2009 Absolvierung des vorklinischen Studienabschnittes  
an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit  
erfolgreichem Abschluss des ersten Abschnittes der  
ärztlichen Prüfung am 10.03.2009

04/2009-05/2013 Absolvierung des klinischen Studienabschnittes an  
der Eberhard Karls Universität Tübingen mit  
erfolgreichem Abschließen des zweiten Abschnittes  
der ärztlichen Prüfung am 08.05.2013

05.06.2013 Erteilung der Approbation als Ärztin

### Famulaturen:

08-09/2009 Josephshospital Warendorf, Abteilung für Innere  
Medizin

---

07-08/2010	Rotunda-Hospital Dublin, Irland, Pädiatrie/Neonatologie
09/2010	Josephshospital Warendorf, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
03/2011	Krankenhaus Herrenberg, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
08-09/2011	Praxisfamulatur Dr. med. M. Haen, Facharzt für Innere Medizin, Hämatologie und internistische Onkologie, Tübingen

**Praktisches Jahr:**

02/2012-06/2012	Innere Medizin, Kantonsspital Nidwalden, Schweiz
06/2012-09/2012	Pädiatrie (Wahlfach), Klinikum Esslingen
09/2012-01/2013	Chirurgie, Klinikum Esslingen

**Berufliche Laufbahn:**

seit 09/2013	Ärztin in Weiterbildung der Fachrichtung Pädiatrie im Diakonie-Klinikum Schwäbisch Hall
--------------	--

---

## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Stenzl, dem Ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik der Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. Schwenter, meinem betreuenden Doktorvater und Herrn J. Hennenlotter, dem wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Mitglieder des urologischen Labores von mir eigenständig durchgeführt. Bei den immunhistochemischen Färbungen stand mir Frau U. Kühns, medizinisch-technische Assistentin des urologischen Labors unterstützend zur Seite.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. T. Todenhöfer durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Schwäbisch Hall, 05.11.2015

---

## Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Rausch, S., Hennenlotter, J., Teepe, K., Kuehs, U., Aufderklamm, S., Bier, S., Mischinger, J., Gakis, G., Stenzl, A., Schwentner, C. and Todenhofer, T. (2015). "Muscle-invasive bladder cancer is characterized by overexpression of thymidine kinase 1." Urol Oncol.

Rausch, S., Hennenlotter, J., Scharpf, M., Teepe, K., Kuehs, U., Aufderklamm, S., Bier, S., Mischinger, J., Gakis, G., Stenzl, A., Schwentner, C. and Todenhofer, T. (2016). "Prostate tumor overexpressed 1 in invasive urothelial carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol.