

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Bedeutung der Insulinrezeptor- β -subunit für die
Tumorbiologie des muskelinfiltrierenden Harnbla-
senkarzinoms vor dem Hintergrund *Diabetes-as-*
*soziierter Stoffwechselalterationen***

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

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

vorgelegt von

Exner, Lisanne Christin

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. T. Todenhöfer

2. Berichterstatter: Professorin Dr. med. C. Reisenauer

Tag der Disputation: 09.04.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Die Harnblase	8
1.1.1 Anatomische Gegebenheiten der Harnblase	8
1.1.2 Das Urothel.....	9
1.2 Das Harnblasenkarzinom	10
1.2.1 Epidemiologie	10
1.2.2 Risikofaktoren	10
1.2.3 Klinik.....	11
1.2.4 Klassifikation.....	11
1.2.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms.....	13
1.2.6 Therapie des Harnblasenkarzinoms.....	15
1.2.7 Nachsorge nach primärer Therapie.....	18
1.2.8 Prognose des Urothelkarzinoms und molekulare Biomarker	18
1.3 Diabetes mellitus und die Assoziation mit Tumorerkrankungen	23
1.3.1 Diabetes mellitus und die Risikosteigerung beim Harnblasenkarzinom	24
1.4 Der Insulinrezeptor-β und sein Signalweg	25
1.5 Proteinkinase B und ihre tumorbiologische Bedeutung	27
1.5.1 Proteinkinase B / AKT	27
1.5.2 Bedeutung von AKT in der Tumorbiologie	28
1.6 Fragestellung	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Datenschutz	31
2.2 Ethische Aspekte	32
2.3 Beschreibung des Patientenkollektivs	33
2.4 Tissue Microarray (TMA)	35
2.4.1 Herstellungsprinzip der Tissue Microarray	36
2.5 Immunhistochemie	38
2.5.1. Allgemeine Aspekte	38
2.5.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen für AKT und Insulin- β -subunit	38

2.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	42
2.6.1 Deskriptive Beschreibung des Färbeverhaltens.....	43
2.7 Aktualisierung des Follow-up's und Erhebung des <i>Diabetes</i>-Status	44
2.8 Biometrie	45
2.8.1 Häufigkeitsverteilungen	45
2.8.2 Wilcoxon-/Kruskal-Wallis -Test.....	45
2.8.3 Ereigniszeitanalyse.....	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Beschreibung des Studienkollektivs.....	47
3.2 Krankheitsverlauf bei Diabetikern und nicht-Diabetikern.....	50
3.2.1 Rezidivfreies Überleben	50
3.2.2 Krankheitsspezifisches Überleben.....	50
3.2.3 Gesamtüberleben.....	51
3.3 Auswertung des Färbeverhaltens	52
3.4 Insulinrezeptor-β.....	55
3.4.1 Insulinrezeptor- β Tumorgewebe <i>versus</i> Insulinrezeptor- β Normalgewebe	55
3.4.2 Expression des Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch-pathologischer Faktoren	56
3.4.3 Expression des Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch-pathologischer Faktoren bei Diabetikern und nicht-Diabetikern.....	58
3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse Insulinrezeptor- β	60
3.5 AKT.....	61
3.5.1 AKT Tumorgewebe <i>versus</i> AKT Normalgewebe.....	61
3.5.2 Expression AKT im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch -pathologischer Faktoren	62
3.5.3 Expression AKT im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch-pathologischer Daten bei Diabetikern und nicht-Diabetikern.....	64
3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse AKT.....	66
3.6 Interaktionen	67
3.6.1 Insulinrezeptor- β -subunit <i>versus</i> AKT im Gesamtkollektiv der Normalgewebe und Tumorgewebe	67
3.6.2 Insulinrezeptor- β vs. AKT bei Diabetikern und nicht-Diabetikern	68
3.6.3 Einfluss der Parameter auf die Krankheitsverläufe.....	69
4 Diskussion	77
4.1 Das Studienkollektiv.....	77

4.2 Einfluss von <i>Diabetes</i> auf das Harnblasenkarzinom	78
4.3 Insulinrezeptor-β und das Harnblasenkarzinom.....	80
4.4 AKT und das Harnblasenkarzinom	82
4.5 Interaktion von Insulinrezeptor-β und AKT	84
4.6 Biomarker des Krankheitsverlaufes.....	86
4.6.1 Insulinrezeptor- β als möglicher Marker für die Prognose des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms	86
4.6.2 AKT und Krankheitsverlauf.....	86
4.6.3 <i>Diabetes</i> und Krankheitsverlauf.....	87
5 Zusammenfassung.....	89
6 Abbildungsverzeichnis.....	91
7 Tabellenverzeichnis.....	95
8 Literaturverzeichnis	96
9 Erklärung zum Eigenanteil	129
10 Danksagung	130

Abkürzungsverzeichnis

A

AUA.....*American Urological Association, American Urological Association*

B

BCG.....*Bacillus Calmette-Guérin*

D

DAB.....*Chromogen-3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid*

DNA.....*Desoxyribonukleinsäure*

DSGVO.....*Datenschutzverordnung*

E

EMA.....*European Medicines Agency*

F

FDA.....*Food and Drug Administration*

G

G₁-Phase.....*Gap-Phase*

H

HE.....*Hämotoxylin-Eosin*

I

IRS.....*Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner*

ISH.....*klinisches Informationssystem von Cerner*

M

min.....*Minute*

mTOR.....*mechanistic Target of Rapamycin*

P

PD.....*programmed cell death*

PI3K.....*Phosphoinositid-3-Kinasen*

R

RNA.....*Ribonukleinsäure*

S

sek.....*Sekunde*

S-Phase*Synthese-Phase*

T

TMA *Tissue Microarray*

TUR-B *Transurethrale Resektion*

U

UKT *Uniklinik Tübingen*

1 Einleitung

1.1 Die Harnblase

1.1.1 Anatomische Gegebenheiten der Harnblase

Die Harnblase ist ein Hohlorgan und dient der Speicherung von etwa 900 – 1500ml Sekundärurin (Rizzo 2015). Sie besteht aus der *Apex vesicae*, dem *Corpus vesicae*, in den die Ureteren münden, dem *Fundus vesicae* und dem *Collum vesicae*. Sie liegt bei beiden Geschlechtern präperitoneal im kleinen Becken. Begrenzt wird sie kranial und dorsokranial vom Peritoneum, ventral grenzt sie an die Symphyse mit dem vom Peritoneum gebildeten *Spatium retropubicum*, dorsal hat sie Bezug zum *Sigmoid / Rectum* und bei der Frau zum *Uterus*. Kaudal geht sie in die Harnröhre über (Jl 1991) (Large 2016).

1.1.2 Das Urothel

Das Urothel beschreibt ein mehrreihiges und mehrschichtiges Übergangsepithel, das die Schleimhaut der ableitenden Harnwege, wie die Nierenbecken, Ureteren, Harnblase und den Anfangsteil der *Urethra*, auskleidet. Wie in **Abbildung 1** dargestellt, wird die *Mukosa* in drei verschiedene Schichten unterteilt: Deckzellschicht, Zwischenzellschicht und Basalzellschicht. Die Basalzellschicht dient der Erneuerung des Urothels. Die Deckzellschicht muss dagegen den besonderen anatomischen Anforderungen wie einem hohen osmotischen Gradienten, sowie einer großen Ausdehnung durch Volumenänderung standhalten (Fry and Vahabi 2016). Geschützt wird das Urothel durch eine Glykokalyx, die aus Glykosaminoglykanen besteht (Friedrichs et al. 1985). Unterhalb der *Mukosa* befindet sich die *Lamina propria mucosae*, die an die *Tunica muscularis* der Harnblase grenzt (Manski 2017b).

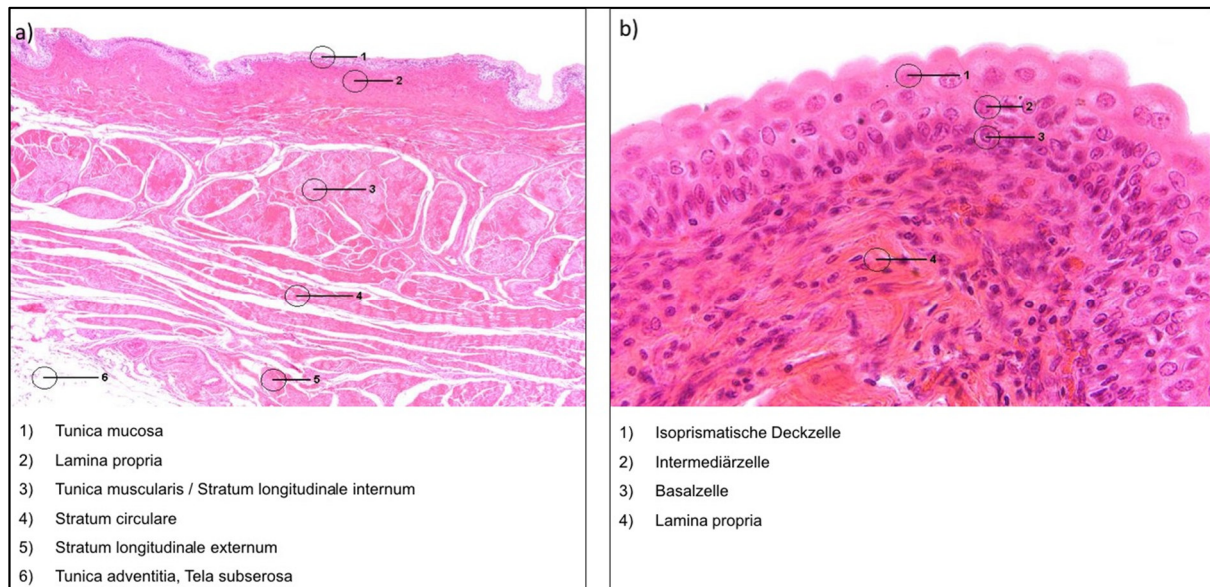


Abbildung 1ab: Histologie der Harnblase (a) aller Schichten und (b) des Übergangsepithels (Uni Halle-Wittenberg, download 2017).

1.2 Das Harnblasenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom stellt die zweithäufigste Tumorentität des Urogenitaltraktes dar (Shinagare et al. 2011). Weiterhin zählt es weltweit zu einer der häufigsten malignen Tumorerkrankungen (vom Dorp et al. 2007). Die höchste Inzidenz verzeichnet man in westeuropäischen Ländern (Kakehi et al. 2010). Im Jahr 2012 wurden in Deutschland 11.240 Neuerkrankungen bei Männern und 4.140 bei Frauen diagnostiziert, wobei 3.791 Männer und 1.826 Frauen an der Erkrankung verstarben (Robert-Koch-Institut 2015). Somit liegt das Harnblasenkarzinom an 10. und 14. Stelle der häufigsten Krebstodesursachen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 73 Jahren bei Männern und 77 Jahren bei Frauen. Die relative Überlebensrate liegt bei Männern mit 59 % höher als bei Frauen mit 50 %. Als Korrelation lässt sich eine günstigere Verteilung der Tumorstadien bei Männern feststellen.

Harnblasenkarzinome sind bis zu 95 % auf die Entartung des Urothels, auch Transitionalzellkarzinom genannt, zurückzuführen (Clark et al. 2013) (Manski 2017). Zu einem kleinen Prozentsatz (in westlichen Ländern) kommen Plattenepithelkarzinome (2 %) und Adenokarzinome (1 %) vor (vom Dorp et al. 2007). Selten treten Harnblasenkarzinome in Form von Phäochromozytomen, Leiomyosarkomen und Rhabdomyosarkomen auf.

1.2.2 Risikofaktoren

Die Risikofaktoren für ein Harnblasenkarzinom können in genetische und umweltbedingte Risikofaktoren eingeteilt werden. Den wichtigsten Risikofaktor stellt das Rauchen dar (Burger, Catto, et al. 2013). Hierbei sind vor allem die darin enthaltenen Stoffe, wie aromatische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe ausschlaggebend. Zudem sind das Alter, das Gewicht, die sportliche Aktivität, die berufliche Exposition zu Stoffen wie Arylaminen und Benzolderivaten, chronische Reizzustände und eine zurückliegende Chemo- oder Radiotherapie anerkannte Risikofaktoren (Liss et al. 2016). Kontrovers diskutiert wird die Rolle von bestimmten Lebensmitteln wie Kaffee, rohes Fleisch, oder Softdrinks (Burger, Catto, et al. 2013) (DKG Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2016).

1.2.3 Klinik

Das Harnblasenkarzinom weist bis in die fortgeschrittenen Stadien nur wenige Symptome auf. Hier gilt als Leitsymptom eine asymptomatische Makrohämaturie (King and Steggall 2014). Deswegen wird in den Leitlinien der *American Urological Association* (AUA) bei wiederholt nachgewiesener asymptomatischer Hämaturie eine urologische Untersuchung empfohlen. In fortgeschrittenen Stadien können unspezifische Reizsymptome, wie zum Beispiel Pollakisurie, Dysurie, Drangsymptomatik und Schmerzen im Beckenbereich auftreten, welche durch eine tumorbedingte Obstruktion verursacht werden können (Clark et al. 2013).

Wie bei anderen Karzinomen besteht ein kongruenter Zusammenhang zwischen Infiltrationstiefe und histologischem Differenzierungsgrad zur sowohl Metastasierungs- wie auch Rezidivrate. Harnblasenkarzinome streuen vor allem in benachbarte Lymphknoten, insbesondere in die iliakalen, obturatorischen, präsakralen und aortalen Lymphknoten (Manski 2017a). Fernmetastasen befallen hauptsächlich das Peritoneum, die Leber, die Lunge oder das Skelett (Shinagare et al. 2011).

1.2.4 Klassifikation

Für die Diagnose, Prognose und Bestimmung der Therapie bei Harnblasenkarzinomen werden die Karzinome in Tumorstadien mit Hilfe des TNM-Klassifikationssystems der UICC (Union internationale contre le cancer) eingeteilt. Hierfür wird die Ausdehnung (T), der Lymphknotenbefall (N) und die Metastasierung (M) beurteilt (**Tabelle 1**). Entscheidend ist die Unterscheidung zwischen nicht-muskelinvasiven und muskelinvasiven Tumoren. Nicht-muskelinvasive Tumoren gehören den Stadien: pTis, pTa und pT1 an und werden insgesamt in circa 70 % der Fälle diagnostiziert. Muskelinvasive Tumore gehören den Stadien \geq pT2 an (Clark et al. 2013) (van Rhijn et al. 2015) und weisen zudem häufiger eine schlechtere Differenzierung als nicht-muskelinvasive Tumoren auf.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation vereinfacht.

T	Primärtumor
T0	Kein Nachweis von Primärtumor
Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein
T2	Tumor dringt in Muskularis propria ein
T3	Tumor dringt in perivesikales Gewebe ein
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch
T4	Infiltration von Nachbarorganen
T4a	Tumor dringt ein in Prostatastoma, Samenbläschen, Uterus, Vagina
T4b	Tumor dringt ein in die Becken- und Bauchwand
N	Regionale Lymphknoten
N0	Keine regionalen Lymphknoten
N1	Metastase in einem Lymphknoten des wirklichen Beckenbereichs
N2	Metastase in mehreren Lymphknoten des wirklichen Beckenbereichs
N3	Lymphknotenmetastasen im Verlauf der Arteriae illiacae communes
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Zusätzlich zur TNM-Klassifikation hat die WHO (*World Health Organization*) und die ISUP (*International Society of Urological Pathology*) für nicht-muskelinvasive Urothelkarzinome eine weitere histologische Einteilung in unterschiedliche Grade (*Grading*) anhand von zytologischen Kriterien definiert. Dabei werden die Karzinome in *high-grade* und *low-grade* eingeteilt, wobei *low-grade* Harnblasenkarzinome besser differenziert sind und eine bessere Prognose als *high-grade* Tumore aufweisen (Babjuk et al. 2017).

1.2.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Das erste Indiz für ein Harnblasenkarzinom ist die asymptomatische Hämaturie. Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom sollte zur ersten Evaluierung eine Urinzytologie, Zystoskopie und eine bildgebende Diagnostik mittels Abdomen / Becken CT, inklusive des oberen Harntraktes erfolgen.

1.2.5.1 Asymptomatische Hämaturie

Die asymptomatische Hämaturie ist häufig das erste Indiz für ein Urothelkarzinom. Deswegen wird in den Leitlinien der *American Urological Association* (AUA) bei wiederholt nachgewiesener asymptomatischer Hämaturie eine urologische Untersuchung empfohlen ("Microhematuria: Asymptomatic - American Urological Association" 2019).

1.2.5.2 Urinzytologie

Die Urinzytologie ist eine nicht invasive Untersuchungsmethode bei der gefärbte Urin- ausstriche mikroskopisch auf maligne Urothelzellen untersucht werden. Hierbei ist die Spezifität und Sensitivität des Tests stark abhängig vom Grad des Tumors, der Qualität der zellulären Bestandteile des Urins und dem Differenzierungsgrad der Zellen. Diese Methode besitzt eine geringe Sensitivität bei *low-grade* und hoch differenzierten Tumoren (Budman, Kassouf, and Steinberg 2008). Weiterhin besteht eine deutliche *Interobserver*-Variabilität (Raitanen et al. 2002). Nichtsdestotrotz, stellt die Urinzytologie eine gängigere Voruntersuchung dar als die Untersuchung auf Mikrohämaturie (Rodgers et al. 2006).

1.2.5.3 Urin- und zellgebundene Harnblasenkarzinommarker

Wegen der geringen Sensitivität der Urinzytologie und der daher häufig durchgeführten invasiven Zystoskopie fokussiert sich die Forschung auf die Identifikation eines spezifischen Urin oder zellgebunden Harnblasenkarzinommarkers. Der Marker sollte mit einfachen technischen Mitteln, geringen Kosten, hoher Zuverlässigkeit und Wiederholbarkeit bestimmbar sein. Durch die intensive Auseinandersetzung wurden bis *dato* viele Marker, wie beispielsweise Zytokeratine und Harnblasenkarzinomantigene gefunden, die mit unterschiedlicher Sensitivität im Zusammenhang mit dem Urothelkarzinom stehen (DKG Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2016). Weiterhin spezialisierten sich viele Studiendesigns auf Biomarkern, die aus dem Urin gewonnen werden können. Larsen et al. fasste in einer retrospektiven Studie die Ergebnisse von insgesamt 57 Studien zusammen. Es wurden 114 Biomarker untersucht. Zwei der

Biomarker zeigten im Durchschnitt eine gute Sensitivität mit einem Median von > 80 %, jedoch mit einer geringen Spezifität (< 60 %). Als Fazit zeigten sie mögliche Studiendesigns mit der Möglichkeit auf validere Ergebnisse zu erreichen (Larsen et al. 2019). Bier et al. zeigten in ihrer Studie eine erhöhte Sensitivität jedoch eine niedrigere Spezifität bei Untersuchung des Urins, der aus dem oberen Harntrakt gewonnen wurde gegenüber aus der Blase gewonnenen Urins (Bier et al. 2018). Trotz dieser Ergebnisse wird die Zystoskopie nicht so schnell von den Biomarkern in der Diagnostik ersetzt werden können. Lediglich bestehe die Möglichkeit die Anzahl der Zystoskopien durch die Einteilung in aggressive und weniger aggressive Tumore anhand der Analyse von DNA, mRNA sowie cfDNA zu reduzieren (Maas et al. 2018).

Bei keinem der Marker konnte jedoch eine zufriedenstellende Sensitivität sowie Spezifität erreicht werden, sodass er sich nicht zum Screening, Früherkennung oder als Verlaufsparemeter eignet (Babjuk et al. 2011a). Die meisten Marker sind nur sinnvoll auf bestimmte Patientenkollektive mit speziellen klinischen Kontexten, wie Tumorausdehnung, Primär- / Rezidivläsion, etc. anzuwenden. Daher empfiehlt die *deutsche Gesellschaft für Urologie* (DGU) kein systematisches Screening zur Früherkennung (Babjuk et al. 2011b) (Stephenson, Kuritzky, and Campbell 2007). Lediglich innerhalb von Studien oder bei Hochrisikogruppen können Urin- oder Blutuntersuchungen sinnvoll sein, um ein Karzinom gegebenenfalls in einem früheren Stadium erkennen zu können (Lotan, Svatek, and Malats 2008). Weiterhin ist die Evidenz der bereits durchgeführten Studien zu gering, sodass die Biomarker zunächst in klinischen, prospektiven und randomisierten Studien reevaluiert werden müssen (Soria et al. 2019).

1.2.5.4 Zystoskopie und transurethrale Resektion

Die Spiegelung der Harnblase ist dagegen ein invasives Verfahren, welches sowohl zur Primärdiagnostik wie auch in der Therapie der Harnblase eingesetzt wird. Es besitzt eine hohe Sensitivität und kann aufgrund dessen weder durch die Zytologie noch durch Untersuchung biologischer Marker ersetzt werden (Babjuk et al. 2011b). Limitiert wird die Untersuchung durch die Fehlerquote beim Erkennen von flachen, kleineren Tumoren, sowie CIS Tumoren. Durch den Einsatz der photodynamischen Diagnostik konnte mittlerweile die Detektionsrate von flachen und papillären Läsionen deutlich erhöht werden ($p < 0,001$). Somit findet sich eine signifikante Steigerung der Detektion des Harnblasenkarzinoms vor allem der Ta und T1 Läsionen (Burger, Grossman, et

al. 2013). Zusätzlich zeigt sich eine signifikante Reduktion der Tumorrezidive nach 9 Monaten; die relative Reduktion liegt bei 16 % (Stenzl et al. 2010).

Direkt im Anschluss an eine Zystoskopie kann eine transurethrale Resektion (TUR-B) erfolgen, welche die Standardtherapie bei nicht-muskelinvasiven Tumoren ist. Das gewonnene Gewebe sollte bei zystoskopisch gestellter Verdachtsdiagnose zur histologischen Untersuchung genutzt werden (Woldu, Bagrodia, and Lotan 2017) (Babjuk et al. 2011b). Weitere Behandlungsmaßnahme bei suspekt erscheinenden nicht-muskelinvasiven Karzinomen wäre die direkte intravesikale Gabe Chemotherapie mittels Gemcitabine oder Mitomycin (Budman, Kassouf, and Steinberg 2008). Bei suspekten Befunden, die sich ungestielt zeigen und eher zu *high-grade* Tumoren zuzuordnen sind, empfiehlt es sich eine Biopsiekartierung durchzuführen.

Anschließend erfolgt die Einteilung in nicht-muskelinvasive und muskelinvasive sowie die Zuordnung des jeweiligen Tumorstadiums. Hiernach wird die weitere Therapie angepasst.

1.2.5.5 Staging

Zur Evaluation der Ausdehnung des Tumors und dem Erkennen von ggf. Lymphknotenmetastasen sowie Fernmetastasen wird bei gesicherter Diagnose eines Harnblasenkarzinoms die Diagnostik mittels bildgebenden Verfahren erweitert. Hierzu zählen die Sonografie, Computertomographie und intravenöse Urographie.

1.2.6 Therapie des Harnblasenkarzinoms

Die Therapie der nicht-muskelinvasiven Tumore unterscheidet sich je nach Klassifikation. Vorangestellt sei allen nicht-muskelinvasiven Tumoren die bereits erfolgte operative Entfernung mittels TUR-B bei Diagnosesicherung. Bei *low-grade* Tumoren der Klasse Ta wird zunächst ein zuwartendes Procedere empfohlen. Fakultativ kann die adjuvante, intravesikale Gabe von Chemotherapeutika erfolgen. Bei *high-grade* Ta Tumoren wird bei einer unvollständigen Resektion durch eine TUR-B in jedem Fall eine erneute Resektion empfohlen. Als adjuvante Therapie wird die Infiltration des Mykobakteriums *Bacillus-Calmette-Guerin* (BCG) als Immuntherapie empfohlen. Allerdings liegt die Heilbarkeit der Patienten mit *carcinoma in situ* lediglich bis 50%. Die Therapie führt bisweilen zu sowohl lokalen (Zystitis) als auch systemischen (u.a.

allgemeines Unwohlsein) Nebenwirkungen (Brausi et al. 2014). Alternativ kann adjuvant eine intravesikale Chemotherapeutikagabe erfolgen. Bei Tumoren der Klasse T1 würde man immer strengstens die Nachresektion per TUR-B empfehlen. Zu den adjuvanten Therapien zählen hier ebenfalls die Injektion von BCG, die intravesikale Gabe von Chemotherapeutika, sowie wenn notwendig die Zystektomie. Bei Therapieversagen ist die Radikalisierung der Behandlung zu jedem Zeitpunkt möglich.

Malmström *et al.* konnten mit Hilfe einer Metaanalyse aufzeigen, dass die Rezidivrate signifikant durch die Kombination aus einer operativen und einer medikamentösen Therapie reduziert wird (Malmström et al. 2009) (DKG Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2016). Bei nicht Ansprechen oder Versagen der Therapie kann die Behandlung durch systemische Gabe von Chemotherapeutika oder durch eine offene radikale Zystektomie ergänzt werden.

Bei den Tumoren des Stadiums T2 sollten weitere bildgebende Verfahren im Sinne eines Stagings vor weiterer Behandlung durchgeführt werden. Hierzu gehören beispielsweise eine MRT Diagnostik des Abdomens und Beckens, sowie Röntgen oder CT-Thoraxaufnahmen und eine Knochenszintigrafie beim Vorliegen von metastasensuspekten Knochenbefunden. Bei fehlendem Lymphknotenbefall wird neoadjuvant zum einen eine Cisplatin-basierte Chemotherapie mit folgender radikaler und in seltenen Fällen partieller Zystektomie empfohlen. Die radikale Zystektomie zählt als der Goldstandard bei muskelinvasiven Harnblasentumoren. Nach der radikalen Entfernung gibt es drei verschiedene Möglichkeiten der Harnumleitung: eine abdominelle, urethrale und rektosigmoidale. Die orthotrope Neoblase ist durch ihren Vorteil der erhaltenen Kontinenz in vielen Zentren zum Goldstandard geworden (DKG Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF 2016). Mittlerweile existiert die Möglichkeit die Zystektomie, wie auch die Anlage der Neoblase Roboter-assistiert durchzuführen (Fahmy et al. 2015). Es zeigt sich ein ähnliches onkologisches Outcome bei kürzerem Krankenhausaufenthalt sowie geringerem Blutverlust (Sim et al. 2015).

In Ausnahmefällen kann alternativ zur radikalen Zystektomie neoadjuvant mittels Chemoradiotherapie behandelt werden. Bei vollständigem Tumorregress nach 2 – 3 Monaten sollten regelmäßige Nachkontrollen stattfinden; bei weiterhin Vorliegen eines Tumors wird entweder eine intravesikale Injektion von BCG oder eine chirurgische Resektion empfohlen.

Bei Tumoren im Stadium III gleichbedeutend mit cT3 N0, cT4a N0, cT1-T4a N1 wird zunächst wie im Stadium II therapiert. Die Unterschiede zeigen sich in der Nachbehandlung. Im Stadium III sollte adjuvant eine Radiotherapie oder eine auf Cisplatin-basierende Chemotherapie erfolgen, wenn dies nicht bereits neoadjuvant durchgeführt wurde.

Bei Krebserkrankten liegt das 5-Jahres-Tumorspezifischen Überlebens in Prozent entsprechend dem Tumorstadium bei pTa bei 75 - 100, bei pT1 bei 85 - 100, bei pT2 bei 73-89 und bei pT3 bei 41 - 62 und bei pT4 bei 0 – 29 (Morioka et al. 2001). Aus diesem Grund wird in den Behandlungsleitlinien bei Tumorstadien > pT2 eine neoadjuvante Radiotherapie oder eine (neo-) adjuvante Chemotherapie empfohlen. Widmark *et al.* beschreibt eine Reduktion des Tumors durch die neoadjuvant durchgeführte Bestrahlung, jedoch konnte kein Nutzen bezüglich der Gesamtüberlebensrate nachgewiesen werden (Widmark et al. 2003). In der Chemotherapie wird hauptsächlich Cisplatin als Monotherapeutikum eingesetzt oder auf Cisplatin-basierende Pharmaka angewendet. Allerdings liegen keine eindeutigen Beweise für ein besseres *Outcome* mit zusätzlicher Chemotherapie beim Blasenkarzinom vor (Rose and Milowsky 2016). Die Organisation *European Medicines Agency* (EMA) empfiehlt bei Versagen der Ersttherapie Vinflinen als weitere Therapieoption. Unter Vinflinen konnte eine Verlängerung der Gesamtüberlebensrate beobachtet werden (Oing et al. 2016). Diese konnte jedoch von Moriceau und Kollegen nur bei ausgewählten Patientengruppen nachgewiesen werden (Moriceau et al. 2015). Die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) hat keine der weiteren Standardchemotherapeutika, wie Carboplatin, Gemcitabin, Paclitaxel als second-line Therapien genehmigt. Die Allein- oder Kombinationstherapie der oben genannten Zweitlinientherapien hat sich bezüglich der Gesamtüberlebensrate oder des Nebenwirkungsprofils erwiesen in klinischen Studien bislang nicht als vorteilhaft (Dreicer 2009).

Bei Tumoren ab Stadium III sollte der Tumor zunächst down-gestaged werden. Hierfür sollte zunächst eine systemische Chemotherapie oder eine Radiochemotherapie erfolgen. Die Weiterbehandlung erfolgt bei Tumoren cT1-4a N2-3 nach vollständigem Ansprechen chirurgisch mittels Zystektomie. Eine Radiochemotherapie erfolgt bei partiellem Ansprechen. Bei Tumorprogress erfolgt die Weiterbehandlung analog der Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms.

Ab Stadium IV wird zunächst ebenfalls mit systemischer Therapie oder Radiochemotherapie behandelt. Anschließend besteht die Möglichkeit mit einer erneuten TUR-B, Radiochemotherapie / systemischen Therapie oder Zystektomie zu therapieren. Bei Vorliegen von disseminierten Metastasen wird in jedem Fall die systemische Therapie vorgezogen. Bei muskelinvasiven Harnblasentumoren mit suspekten, ossären Befunden sollte vorab eine weitere Diagnostik mittels MRT / PET-CT oder Knochenszintigrafie erfolgen.

Bei fortgeschrittenen Karzinomen liegt das mediane Überleben unter Therapie mit Cisplatin-basierten Chemotherapieschemata und Zystektomie bei 14 bis 15 Monaten (The Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Somit sind die Erfolgsaussichten für fortgeschrittene Harnblasenkarzinome begrenzt.

1.2.7 Nachsorge nach primärer Therapie

Die Nachsorge bei Tumorpatienten dient der Früherkennung von Rezidiven. Bei nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinomen werden je nach histologischem Grading (*low-, intermediate-, high-risk*) in festgelegten Intervallen Kontrollzystoskopien veranlasst. Dabei werden *high-risk* Tumore für eine längere Zeit in kurzen Zeitintervallen nachuntersucht. Bei längerer Rezidivfreiheit werden die Patienten ausschließlich bei klinischer Indikation kontroll-zystoskopiert. Bei *high-risk* Tumoren sollte zusätzlich zur Nachsorge eine bildgebende Diagnostik alle 1 – 2 Jahre erfolgen. Urintests sollten bei *intermediate-risk* und *high-risk* Tumoren zunächst in regelmäßigem Abstand erfolgen. Zusätzlich kann eine Urinzytologie und eine Immunzytologie durchgeführt werden.

Nach einer radikalen Zystektomie mit Harnableitung gehört zusätzlich zu den oben genannten Nachsorgeprogrammen die bildgebende Diagnostik, wie CT von Thorax / Abdomen sowie zellbasierte Urinuntersuchungen (Urinzytologie, Urethroskopie und Urin-Spülzytoskopie (DKG Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2016). Dies dient zur Erfassung funktioneller Störungen sowie metabolischer Veränderungen.

1.2.8 Prognose des Urothelkarzinoms und molekulare Biomarker

Die 5-Jahresüberlebensrate liegt zusammenfassend über alle Tumorstadien berechnet für Männer bei 69 % und für Frauen bei 66 % (Crocetti 2017), wobei die Überlebensrate in niedrigeren Stadien höher ist (Stadium 0: 98 %, Stadium I: 88 %, Stadium II: 78 %, Stadium III: 58 %, Stadium IV: 28 %).

Stadium II: 63 %, Stadium III: 46 %, Stadium IV: 15 %) ("Survival Rates for Bladder Cancer" 2018).

Trotz der radikalen Methode der Therapie ist die Überlebensrate niedrig. Für die Weiterentwicklung von Therapiemöglichkeiten sollte man sich die negativen Prognosefaktoren anschauen. Zu diesen zählen vor allem das Zeitintervall bis zur radikalen Zystektomie sowie das weibliche Geschlecht, ein höheres Lebensalter, Adipositas, reduzierter Allgemeinzustand, Komorbiditäten und histologische Parameter (z.B. pT- und pN- Stadium, lymphovaskuläre Invasion). Molekulare Marker, wie die Zellzyklusregulatoren (p53, p21, Cyclin E), Proliferations- (Ki-67) und Apoptosemarker (Survivin) können als unabhängige Prognosefaktoren die Vorhersagegenauigkeit verbessern (Nakagawa et al. 2017). Bei oberflächlichen Tumoren wurden hypermorphie Mutationen in den Onkogenen Ras und FGFR3 beobachtet. Dagegen wurden bei invasiven Tumoren *loss-of-function* Mutationen in den Tumorsuppressorgenen, wie zum Beispiel p53, Retinoblastom und PTEN gefunden (Cordon-Cardo 2008).

Die von Mutationen betroffenen Gene beeinflussen hauptsächlich den Zellzyklus, die Chromatinregulation und den PI3-Kinase-Signalweg (Nandagopal and Sonpavde 2016), (Youssef et al. 2009).

Die membranständigen Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie der vaskuläre Endothelwachstumsfaktor (VEGFR) und der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) können aufgrund ihrer angestoßenen Signalkaskaden im Zellkern Einfluss auf die Zellprogression nehmen. Dies könnte eine Erklärung für die gefundene Assoziation zwischen dem Auftreten von Harnblasenkarzinomen und Mutationen dieser Rezeptoren darstellen. Kopparpapu et al. zeigten, dass die Expression von VEGFR in Harnblasenkarzinomen signifikant höher ist als in gesunder Harnblasenmukosa. Zusätzlich zeigten sie, dass VEGFR höher exprimiert wird in muskelinvasiven Karzinomen im Gegensatz zu nicht-muskelinvasiven Karzinomen (Kopparpapu et al. 2013). EGFR ist eng mit verschiedensten Signalwegen wie beispielsweise Ras-MAPK, PI3K-AKT und JAK verbunden, die zu unterschiedlichen Auswirkungen wie Zellproliferation, Wachstum, Differenzierung und Inhibierung der Apoptose und somit auch zur Tumorentstehung und -progression führen können (Wee and Wang 2017). Zu dem EGFR gehören unter anderem Erb1B-1 und ErbB-2 auch Her-2/neu genannt.

Weiterhin zeigt sich eine Anomalie im Nukleolus insbesondere bei aggressiven und invasiven Urothelkarzinomen im Tumorsuppressorprotein p53 und dem Retinoblastom-Protein. Das Tumorsuppressorprotein p53 in aktivierter Form kann als „Wächter des Genoms“ bezeichnet werden. Es kann den Zellzyklus bei entarteten Zellen unterbrechen um Zeit für die Reparatur der mutierten Zellen zu gewinnen. Bei Irreparabilität von Zellschäden führt dies zum programmierten Zelltod. Bei Verlust dieser inhibitorischen Wirkung können Mutationen an der DNA nur noch unzureichend repariert werden. Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für eine unkontrollierte Vermehrung mutierter Zellen. Der Beweis eines veränderten p53 Proteins kann beispielsweise durch Immunhistochemie erfolgen. (Mitra, Hansel, and Cote 2012). Das Retinoblastom-Protein greift ebenfalls kontrollierend in den Zellzyklus ein. Seine Funktion übt es über den Transkriptionsfaktor E2F aus. Die Funktion des Transkriptionsfaktors ist im Zellzyklus die Initiation des Übergangs von der G₁-Phase in die S-Phase. Das aktivierte Retinoblastom-Protein bindet den Transkriptionsfaktor, der daraufhin seine Funktion nicht mehr ausüben kann. Somit übernimmt es ähnlich wie das Tumorsuppressorprotein p53 eine kritisch regulierende Rolle bei der Zellreplikation (Nevins 2001).

Diese veränderten Gene sind Stellschrauben in den PI3K/AKT/mTOR- (= mechanistic Target of Rapamycin), den MAP-Kinase Signalwegen und den Tyrosinkinaserzeptoren. Hierdurch ergeben sich potenziell therapeutische Zielscheiben (Nandagopal and Sonpavde 2016). Weiterhin zeigen sich direkte genetische Alterationen im PI3K / AKT / mTOR Signalweg. Bis zu 40 % der Urothelkarzinome zeigen eine dauerhafte Aktivierung dieser Signalwege. Dies ist auf verschiedenste Alterationen zurückzuführen. Bekannt hierfür sind inaktivierende Deletionen oder Mutationen in den Tumorsuppressorgenen wie PTEN und TSC1, sowie Mutationen in den *Protoonkogenen*, aktivierende *Amplifikationen* wie bei PIK3CA oder AKT1. Diese Veränderungen konnten bei den verschiedenen Subtypen des Harnblasenkarzinoms festgestellt werden (Houédé and Pourquier 2015).

1.2.8.1 Therapieansätze molekularer Therapien

Es gibt eine Vielzahl an biologisch wirksamen Stoffen, welche die oben beschriebenen deregulierten Signalwege als Therapieziele nutzen. Die Rezeptoren EGFR und HER-2 können z.B. durch Cetuximab, Gefitinib bzw. Lapatinib und Trastuzumab gehemmt werden (Kumar and Madison 2005). Viele dieser Wirkstoffe befinden sich für das Harnblasenkarzinom noch in experimentellen Stadien. Aufgrund von erheblichen

Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Neutropenie, Hypertonie oder Thrombosen bei keiner signifikanten Effektivität mussten viele Substanzen wieder verworfen werden (Oing et al. 2016)(Li et al. 2016).

Besonderes Augenmerk wird zusätzlich auf die Wirkstoffentwicklung der immunmodulierenden Therapie, insbesondere dem Signalweg der PD-Proteinfamilie gelegt. Der Rezeptor PD-1 wird auf der Oberfläche von Immunzellen und speziell T-Zellen exprimiert. Der entsprechende PD-Ligand-1 (PD-L1) wird dagegen auf den Zelloberflächen bestimmter Gewebetypen, wie epithelialen und endothelialen Zellen, exprimiert. Durch die Bindung wird die physiologische Aktivierung der T-Zellen verhindert und somit eine Immunreaktion gegen Normalgewebe inhibiert. PD-L1 und PD-1 tragen durch ihre Bindung miteinander zum Gleichgewicht des Immunsystems bei (Bellmunt et al. 2015). Durch die Expression von PD-L1 umgehen die Tumorzellen dem Immunsystem durch Inhibition der T-Zellen. Dadurch werden PD-1 und PD-L1 als prädikativer Marker und als Zielprotein in der Krebsimmuntherapie genutzt (Sunshine and Taube 2015). Die sogenannten *Immune Checkpoint* Inhibitoren wie Pembrolizumab, Atezolizumab und das Immunglobulin G1k (MPDL3280A) hemmen PD-1 und nehmen einen besonderen Stellenwert in der Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms ein. In den klinischen Studien erwiesen sie sich als gut verträglich und bei Expression des PD-L1 Proteins im Tumorgewebe als effektiv (Teo and Rosenberg 2018). Vor allem stellt die geringere Toxizität einen Vorteil gegenüber den Chemotherapeutika dar. Beispielsweise ist bei einem älteren Patientenkollektiv auf renale Vorschädigungen zu achten (Powles et al. 2014). Aufgrund dessen wurden die Checkpointinhibitoren in den Behandlungsalgorithmus mit aufgenommen. Als Erstlinientherapie werden *Immune Checkpoint* Inhibitoren angewendet, wenn eine cisplatin-haltige Chemotherapie nicht geeignet ist und ein positiver PD-L1 Status vorliegt. Als Zweitlinientherapie gelten sie bei Progression unter oder nach platin-haltiger Chemotherapie (DGU and IABC 2016).

Weiterhin besteht die Möglichkeit in den PI3K / AKT / mTOR Signalweg einzugreifen. Aufgrund der verschiedenen Angriffsziele der Therapie im Signalweg können die Arzneimittel in 5 Kategorien eingeteilt werden. 1. PI3K Inhibitoren 2. PI3K und mTOR Inhibitoren 3. AKT Inhibitoren 4. mTOR Inhibitoren sowie 5. die PDK1 Inhibitoren. Im Folgenden wird näher auf die AKT Inhibitoren eingegangen. Zwei der in Studien aufgeführten Arzneimittel (Perifosine und MK-2260) greifen die PH-Domäne des AKT an. Dies führt zu der Inhibierung der PDK1-abhängigen Aktivierung von AKT und somit zur

Verhinderung der Translokation in die Zellmembran (Stahl, Kon Kim, and Zeidan 2016). Das wirkt sich schlussendlich auf die Zellzyklusregulierung im Sinne der Apoptose aus. Weiterhin besteht die Möglichkeit in die Phosphorylierung von AKT einzugreifen. Hier zeigt sich in Vorläuferstudien, dass bei Geweben mit einer Überexpression von AKT das Tumorwachstum gehemmt wird (Mirzoeva et al. 2011). Trotz der guten Ergebnisse in präklinischen Studien finden sich nur zwei Inhibitoren und zwar der PI3K-Inhibitor sowie der PI3K- und mTOR-Inhibitor in klinischen Studien wieder (Houédé and Pourquier 2015).

Mögliche Angriffspunkte wären zum Beispiel Insulinsensitizer. Allerdings ist dieser Einfluss noch weitestgehend unerforscht (Li et al. 2018)(Koro, Barrett, and Qizilbash 2007)(Govindarajan et al. 2007)(Ramos-Nino, MacLean, and Littenberg 2007).

1.3 *Diabetes mellitus* und die Assoziation mit Tumorerkrankungen

Diabetes mellitus Typ 2 zählt zu einer der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit. Im Jahr 2011 litten 7,2 % (ca. 4,6 Mio. Patienten) der deutschen Bevölkerung im Alter zwischen 18 und 79 an einem *Diabetes* (Robert - Koch - Institut 2016). Die deutsche Diabetes Hilfe geht mittlerweile von über 7 Millionen Diabetes-erkrankten Menschen in Deutschland aus (Prof. Dr. med. Kellerer 2019). Die Zuckererkrankung steht an 12. Stelle, der zu Tode führenden Krankheiten (Giovannucci et al. 2010a). 1960 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen *Diabetes* und Malignomen beschrieben (Giovannucci et al. 2010b). Neueste Forschungen zeigen darüber hinaus eine signifikante Risikosteigerung für das Auftreten von malignen Tumoren beim Vorliegen von *Diabetes mellitus* (Larsson et al. 2006). (Kacalska et al. 2005)(Wang et al. 2013). Die höchste Risikosteigerung (Faktor 2-2,5) wurde für Leberkarzinome und Pankreaskarzinome gefunden. Eine erhöhte Risiko besteht ebenfalls für die Tumoren des Kolons, der Mamma und der Harnblase (McFarland and Cripps 2010). Darüber hinaus scheint die Dauer der *Diabetes*-Erkrankung sowie die Medikation das Risiko Krebserkrankungen zu erhöhen (MacKenzie et al. 2011). (Giovannucci et al. 2010b)(Hirsch et al. 2009)(Oliveras-Ferraros, Vazquez-Martin, and Menendez 2009). Ferner konnte gezeigt werden, dass Diabetiker im Gegensatz zu nicht-Diabetikern erhöhte Mortalitätsraten bei malignen Tumoren aufzeigen. Eine signifikante Mortalitätssteigerung konnte bei Leber-, Brust sowie Blasenkrebs festgestellt werden. Leichte Mortalitätserhöhungen wurden bei Nieren-, Pankreas- sowie Endometriumkarzinomen beobachtet (Barone et al. 2008)(Xu, Zhu, and Zhu 2014). Beim Prostatakarzinom wird dagegen sogar ein vermindertes Risiko bei Patienten mit *Diabetes mellitus* beschrieben. Ein Erklärungsansatz hierfür ist der erniedrigte Testosteronspiegel bei Diabetikern (Giovannucci et al. 2010b)(Xu, Zhu, and Zhu 2014).

1.3.1 *Diabetes mellitus* und die Risikosteigerung beim Harnblasenkarzinom

Die Metaanalyse von Zhaowei *et al.* beleuchtet den Zusammenhang zwischen *Diabetes mellitus* und dem Risiko für Harnblasenkarzinome (Zhu et al. 2013). Grundsätzlich zeigen sich in den Studien heterogene Ergebnisse. So zeigen viele der Studien eine erhöhte Inzidenz für ein Harnblasenkarzinom bei *Diabetes*-Erkrankten. (Zhu, Wang, et al. 2013). Ob dieser Zusammenhang alleinig durch die Zuckerkrankheit oder durch die gemeinsamen Risikofaktoren von Tumoren und *Diabetes* erklärbar ist, konnte bis heute nicht eindeutig bewiesen werden. (Giovannucci et al. 2010b)(Xu, Zhu, and Zhu 2014)(P. Vigneri et al. 2009)(Cantiello et al. 2015).

1.4 Der Insulinrezeptor- β und sein Signalweg

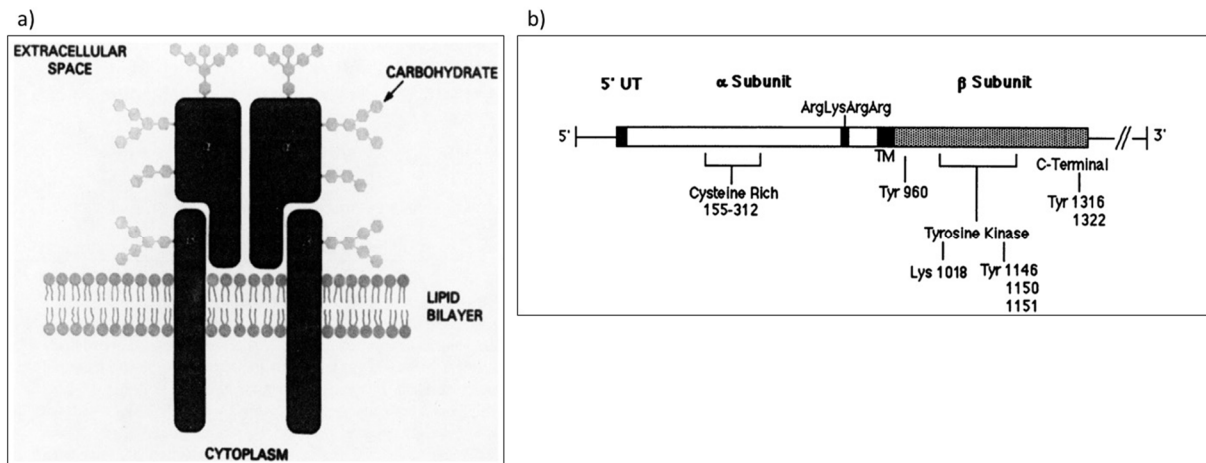


Abbildung 2ab: Struktur des Insulinrezeptors auf der Zelloberfläche (Gorden et al. 1989) (a) und schematische Darstellung des humanen Insulinrezeptors, cDNA (Gorden et al. 1989) (b).

Der Insulinrezeptor ist als Dimer ein integrales Membranprotein. Der Rezeptor besteht aus je zwei α sowie zwei β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (**Abbildung 2a**). Freies Insulin bindet über eine extrazelluläre, Cysteinereiche Region an die α -Untereinheit und aktiviert somit die Tyrosinkinase der carboxyterminalen Region der β -Untereinheit (**Abbildung 2b**). Durch Phosphorylierung werden weitere Signalkaskaden wie Überlebens-Signalwege (MAP-Kinase, Ras) sowie Inhibition von pro-apoptischen Proteinen, Glukoseaufnahme und -speicherung (PI3K, PKB) (Lawlor and Alessi 2001) und Aktivierung der Proteinbiosynthese (mTOR) induziert (Gorden et al. 1989)(Hooper 2017)(Lizcano and Alessi 2002).

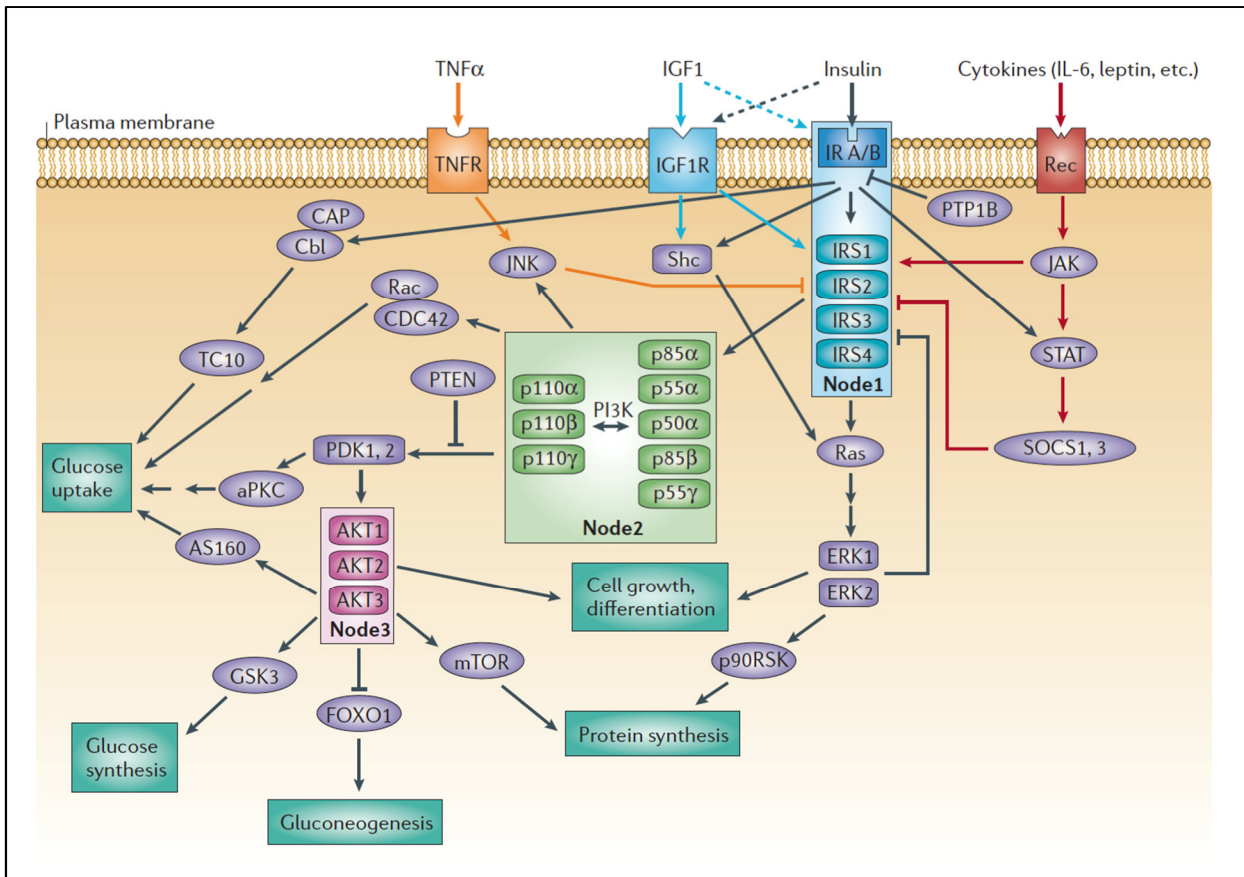


Abbildung 3: Signalkaskade des Insulinsignalweges. (Taniguchi, Emanuelli, and Kahn 2006). Die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor (IR) ist in blau, die daraufhin ausgelösten Signalkaskaden in lila und die Endeffekte in grün dargestellt.

Diese metabolischen und mitogenen Effekte könnten die Rolle von Insulin und Veränderungen im Insulinsignalweg, sowie der Zuckererkrankung bei der Tumorentstehung verschiedener Malignitäten unterstützend erklären. Weiterführend könnte eine Einflussnahme auf den Insulinsignalweg eine Tumorbehandlung unterstützen.

1.5 Proteinkinase B und ihre tumorbiologische Bedeutung

1.5.1 Proteinkinase B / AKT

Die Proteinkinase B (PKB) ist eine Serin- und Threonin-Kinase, von der drei hoch homologe Isoformen (*AKT1/PKB α* , *AKT2/PKB β* , *AKT3/PKB γ*) existieren (Héron-Milhavet et al. 2006). Die Proteinkinase B ist aus einer N-terminalen, sogenannten Pleckstrin Homologie-Domäne, einer zentralen katalytischen Kinase-Domäne, sowie einer C-terminalen Domäne, welche regulatorische Funktionen innehat, aufgebaut (**Abbildung 4**) (Kumar and Madison 2005).

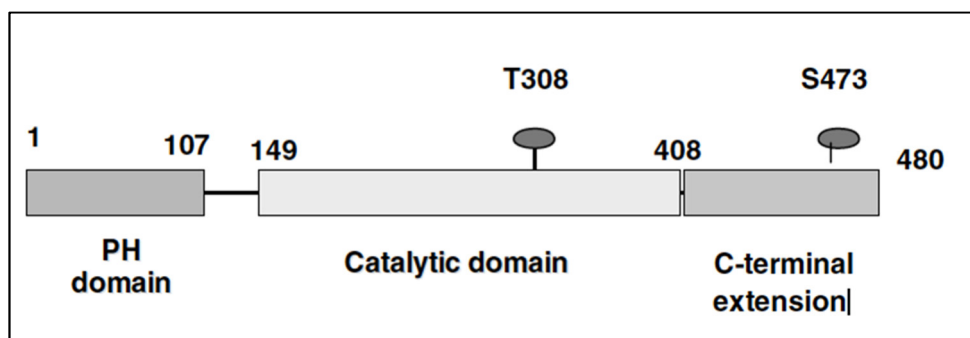


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Proteinkinase B (Kumar and Madison 2005).

Proteinkinasen übertragen Phosphatgruppen auf andere Proteine, wodurch Signalkaskaden initiiert werden können. So nimmt die Proteinkinase B (PKB) Einfluss auf den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Zellproliferation sowie die Apoptose und ist an der Glykogen- und Proteinsynthese beteiligt (Song, Ouyang, and Bao 2005)(Nicholson and Anderson 2002). Reguliert wird ihre Kinaseaktivität über sekundäre Botenstoffe, post-translationale Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen. Durch die Bindung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3), welches durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) produziert wird, an die PH-Domäne der PKB erfährt diese eine Translokation zur Zellmembran. Dort kann die PKB durch weitere Kinasen, wie der Phosphoinositid-abhängige-Kinase1 (PDK-1), mit Hilfe von Phosphorylierungen aktiviert werden, so dass diese wiederum ihre Zielproteine phosphorylieren und damit aktivieren kann (Nicholson and Anderson 2002) (Kubota and Zasshi 2000). Dadurch trägt die PI3K als einer der Aktivatoren zur Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs bei (Zou et al. 2000).

1.5.2 Bedeutung von AKT in der Tumorbilogie

Aufgrund ihrer regulierenden Funktion im Zellkreislauf (Zellwachstum, Zellüberleben, Apoptose) wird AKT eine Rolle bei pathologischen Entartungen von Zellen und bei der Tumorprogression zugesprochen (Manning and Cantley 2007)(Porta, Paglino, and Mosca 2014)(Hers, Vincent, and Tavaré 2011) (Nicholson and Anderson 2002). Darüber hinaus wurden bei Ovarial-, Pankreas-, Magen- und Brusttumoren Amplifikationen in Genen des PKB / AKT Signalwegs entdeckt (Bellacosa et al. 1995) (Cheng et al. 1996), wobei die Anwesenheit von Mutationen mit einem schlechteren Verlauf assoziiert werden konnte (Bellacosa et al. 1995). Weiterhin kann PKB direkt durch Cas-einkinase 2 phosphoryliert und somit aktiviert werden. Beim Urothelkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen dem histologischen Grad und der Expression von Cas-einkinase 2 (CK2) gezeigt werden, wobei eine hohe Expression von CK2 mit höheren Tumorstadien korrelierte (Zhang et al. 2016). Des Weiteren wurde bei einem Knock-down von CK2 weniger aktivierte PKB gefunden. Weiterhin konnte durch Zhang und Kollegen gezeigt werden, dass PKB inhibierende Medikamente wie CX-4945 zu niedrigeren CK2 Expressionen sowie zu geringerer Zellproliferation, Zellmigration und einer erhöhten Apoptose führen (Zhang et al. 2016). Die jeweiligen Funktionen von CK2 und PKB stehen in engem Zusammenhang aufgrund ihrer direkten Interaktionen, sowie den Wechselwirkungen zwischen den nachgeschalteten Effektoren (Ruzzene et al. 2017).

Aufgrund der Überexpression von pAKT in Tumorgewebe beim Harnblasenkarzinom kann dies ein Ansatz für eine zielgerichtete Tumorthherapie darstellen (Harris et al. 2008). Zum Beispiel zeigten Cai et al., dass die Behandlung von Zellkulturen mit betaelemene bei erhöhter Expression von AKT die Phosphorylierung zu pAKT hemmt. Dies führt zu einer verminderten Migration, Proliferation, Invasion, sowie Apoptose von Tumorzellen ohne signifikante Zytotoxizität des normalen Harnblasengewebes (Cai et al. 2018).

1.5.2.1 Potenzielle Interaktionen mit dem Insulinsignalling

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Metformin vor allem in Kombination mit Chemotherapeutika wie Gefitinib die Phosphorylierung von AKT reduziert. Metformin als antidiabetische Therapie kann den positiven Effekt der Therapie verschiedener Krebsarten, somit auch des Harnblasenkarzinoms verstärken. Dies ist ein weiteres

Indiz für den Zusammenhang zwischen der Zuckererkrankung und der Tumorentstehung, sowie Tumorprogression (Peng et al. 2016).

1.6 Fragestellung

Nach aktueller Studienlage scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer *Diabetes mellitus* Typ II Erkrankung und der Prävalenz von Karzinomen des Gastrointestinal-Traktes sowie eine erhöhte Mortalität im Tumorerkrankungsfall zu geben (Pandey et al. 2011)(Giovannucci et al. 2010b)(P. Vigneri et al. 2009)(Zhu, Zhang, et al. 2013)(P. Vigneri et al. 2009)(Xu, Zhu, and Zhu 2014). Inwiefern das Erkrankungsrisiko für das Harnblasenkarzinom bei Diabetikern steigt ist noch nicht abschließend geklärt (Zhu, Wang, et al. 2013)(Turati et al. 2015).

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist die weitere Untersuchung des Zusammenhangs zwischen *Diabetes* und dem Harnblasenkarzinom. Hierfür werden die klinisch-pathologischen und mortalitätsspezifischen Parameter analysiert.

- Besteht eine erhöhte Prävalenz an *Diabetes mellitus*-Erkrankten unter Patienten mit fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom?
- Unterscheiden sich Harnblasenkarzinome bei Diabetikern und nicht-Diabetikern in ihren Charakteristika?

Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Fragestellung inwiefern Veränderungen im Insulinsignalweg eine Rolle beim Harnblasenkarzinom einnehmen.

Für diesen Teil der Studie wurden die insulinspezifischen Proteine Insulinrezeptor- β und Proteinkinase B untersucht.

- Unterscheiden sich die Harnblasenkarzinome in ihren Charakteristika im Hinblick auf die Expression von Insulinrezeptor- β und AKT?
- Findet sich ein Unterschied hinsichtlich der Expression von Insulinrezeptor- β und AKT bei Diabetikern versus nicht-Diabetikern?
- Inwiefern interagieren die Expression von Insulinrezeptor- β zu AKT? Zeigt sich eine Beeinflussung des AKT-Signalweges?
- Zeigt sich eine Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs vom Expressionsgrad der Marker?

2 Material und Methoden

2.1 Datenschutz

Die Datenschutzverordnung (DSGVO) wurde bei der gesamten Studie sowohl bei der Erhebung wie auch bei der Auswertung der für die Doktorarbeit benötigten Daten eingehalten. Die für die experimentelle Arbeit erforderlichen Daten wurden aus den Patientenakten aus dem Krankenhausarchiv oder dem klinischen Informationssystem der Uniklinik Tübingen (ISHmed) entnommen. Hierfür getätigte Telefongespräche wurden von Klinik internen Telefonen unternommen. Jeglicher Emailverkehr verlief über interne Emailadressen der UKT und wenn nötig wurden die Daten zusätzlich verschlüsselt. Auf das Patientensystem ISHmed wurde ausschließlich von internen Rechnern zugegriffen. Die herausgesuchten Daten wurden der Datenbank hinzugefügt. Auf die Datenbank wurde ausschließlich von klinikinternen Rechnern zugegriffen. Außerdem wurde die Datenbank mit einem Kennwort geschützt. Zur statistischen Auswertung waren die Patientendaten anonymisiert. Dementsprechend konnten keine Rückschlüsse auf Patienten erfolgen. Die folgende Analyse wurde an einem internen, vom Kliniknetzwerk abgekoppelten und nicht internetfähigen Rechner vorgenommen. Während des gesamten Projekts wurde mit den Daten vertraulich umgegangen und im Sinne des Datenschutzgesetzes gearbeitet.

2.2 Ethische Aspekte

Die vorliegende Arbeit wurde als Bestandteil eines Verbundprojektes „Expression onkologisch relevanter Proteinparameter beim muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase“ erstellt. Die Ethikkommission erteilte die Genehmigung zu dieser retrospektiven Studie. Es wird in diesem Gesamtprojekt die Expression verschiedener Proteinparameter immunhistochemisch mittels Tissue Microarray (TMA) dargestellt (Votum vom 29.05.2013 / Ethik-Kommission Nr. 279/2013B02).

2.3 Beschreibung des Patientenkollektivs

Die experimentelle Arbeit basiert auf einem Ursprungskollektiv an Patienten, die seit Dezember 1984 bis Dezember 2006 an der Universitätsklinik für Urologie eine Zystektomie aufgrund eines Harnblasenkarzinoms haben durchführen lassen. Dies galt als primäres und grundsätzliches Einschlusskriterium der Studienkohorte. Für die weiteren wissenschaftlichen Arbeiten wurde diese Datenbank mit persönlichen, krankheitsspezifischen und onkologischen Informationen erweitert. Somit wurde eine möglichst genaue onkologische Kartei dieser Patienten angelegt. Die Datenbank besteht aus persönlichen Angaben wie Name, Alter, Geschlecht, Adresse, ... sowie aus klinisch pathologischen Daten wie der TNM-Klassifikation, Therapie, allgemeiner Krankheitsverlauf, Rezidiv (ja/nein und Datum), und dem tumorabhängigen Versterben. Alle diese Daten wurden in einer Datenbank zusammengeführt.

Für die Forschungsarbeiten war es zwingend, dass von jedem Patienten ein Paraffinblock, der aus dem bei der Zystektomie entnommenen Gewebe hergestellt wurde, vorlag. Dies war bei den Patienten, die vor Januar 1996 zystektomiert wurden nicht der Fall, warum diese von dem Patientenkollektiv ausgeschlossen wurden. Für die Auswertung war es ebenfalls entscheidend, dass ein histopathologisch karzinomatöses Gewebe im Zystektomiepräparat festgestellt werden konnte. Weitere Ausschlusskriterien ergaben sich aus einer mehrmaligen Sichtung der Kohortenstudie. Somit wurde die Datenbank bereinigt, um realistische Ergebnisse aus der Forschungsarbeit zu erzielen.

Einschlusskriterien:

- Zystektomie zwischen den Jahren 1984 und 2006 in der urologischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen
- Vorliegen eines Paraffingewebes
- Vorliegen eines Schnittpräparats mit histo-pathologischer Aufarbeitung

Ausschlusskriterien:

- zu wenig Paraffingewebe
- durch Entnahme einer Biopsie aus dem Paraffinblock ungenügendes Übrigbleiben von Tumorgewebe in Bezug auf die routinemäßige Asservationspflicht
- Patienten mit Infiltrationen von anderen Malignomen

Nach Anwendung der Ausschlusskriterien blieb eine Anzahl von 112 Patienten für das oben genannte Forschungsvorhaben übrig.

2.4 Tissue Microarray (TMA)

Beim Tissue Microarrays werden Gewebezylinder unterschiedlicher Herkunft auf einem Paraffinblock zusammengesetzt. Das Prinzip der TMA wird je nach Fragestellung für die effiziente Analyse von Proteinen mittels immunhistochemischer Färbung, für den RNA-Nachweis mittels *in-situ*-Hybridisierung und für den DNA-Nachweis mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung genutzt. Erstmals berichtet Kononen 1998 von dem Prinzip der TMA (Kononen et al. 1998). Das Funktionsprinzip des TMA beruht auf dem Prinzip eines Hochdurchsatzverfahrens (Schoenberg Fejzo and Slamon 2001). In der molekularbiologischen Forschung wird dieses Prinzip gehäuft angewendet. So können zum Beispiel mittels des Proteinnachweises potenzielle Biomarker entdeckt und ihre Rolle in Diagnostik, Prognostik oder Therapie weiter erforscht werden (Kuefer et al. 2004). Gerade für das *high-grade* Harnblasenkarzinom konnten mittels dieser Technik eine Anzahl an Genen identifiziert werden, die sowohl diagnostisch, prognostisch, wie therapeutisch eine Bedeutung spielen können (Stenzl and Gakis 2016).

Dieses Prinzip des TMA bietet im Gegensatz zu anderen etablierten Verfahren wie der konventionellen Immunhistochemie vielerlei Vorteile. Bezogen auf die hier vorliegende experimentelle Studie spiegeln das vor allem die folgenden Punkte wieder: um valide und auf die Allgemeinbevölkerung übertragbare Ergebnisse zu erzielen, sollte an einem großen Datensatz und an einer hohen Anzahl an Patienten geforscht werden. Das hierfür benötigte Tumorgewebe wäre mittels konventioneller Immunhistochemie an Einzelschnittpräparaten schnell aufgebraucht. So kann zu Anfang bei der Herstellung von TMA eine Amplifikation vorgenommen werden. Aus einem Paraffinblock können bis zu 100.000 Assays hergestellt werden. Zusätzlich können in einem Durchlauf auf einem einzelnen Schnittpräparat mehrere hundert Proben gleichzeitig untersucht werden. Daraus ergeben sich weitere Vorteile zum einen eine höhere Reliabilität und Qualität der Ergebnisse durch eine größere Kohorte, die auf einmal untersucht werden kann, und zum anderen eine höhere Standardisierung durch die simultane Färbung aller TMA's. Damit werden alle TMA's unter den gleichen Bedingungen hergestellt. Einer Verfälschung aufgrund unterschiedlicher Ausgangsbedingungen wird somit vorgebeugt. Das Verfahren ist gegenüber der konventionellen Immunhistochemie deutlich schneller und effizienter.

2.4.1 Herstellungsprinzip der Tissue Micrarray

2.4.1.1 Gewebeaufarbeitung des Zystektomiepräparates als Grundlage für die Herstellung der TMA

Für die Herstellung benötigt man Paraffingewebe und Hämotoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte (HE). Zu diesem Zwecke wurden zu jedem Patienten des Kollektivs zwei Paraffinblöcke aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen herausgesucht. Ein Paraffinblock enthielt repräsentatives Gewebe mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom, der andere sollte repräsentatives Normalgewebe enthalten. Diese Paraffinblöcke wurden mit einem HE-Schnitt, der schon existierte oder neu hergestellt wurde, ergänzt. Die HE-Schnitte wurden genutzt, um bei der Herstellung der TMA repräsentatives Normalgewebe und muskelinvasives Tumorgewebe aufzufinden und verwenden zu können. Diese Bereiche wurden auf den HE-Schnitten von Pathologen mittels Filzstiften exakt markiert.

2.4.1.2 Herstellungsprinzip

In der **Abbildung 5** wird die Herstellung und die Weiterverarbeitung der TMA vereinfacht dargestellt. Der Donorblock stellt in diesem Fall den Paraffinblock dar. Mittels Hohlnadeln werden nun Zylinder in der Größe zwischen 0,3mm bis 2mm entnommen und auf den Empfängerblock aufgetragen. An welchen Stellen die Zylinderstanzen das Gewebe entnehmen wird mit Hilfe von HE-gefärbten und hierdurch markierten Gewebebereichen entschieden. Der Empfängerblock ist ein Paraffinblock, in den Löchern eingearbeitet wurden, um die jeweiligen Zylinderstanzen einzusetzen. Dieser Vorgang kann bis zu mehrere hundert Male wiederholt werden. Es wurden Stanzen aus tumorösen, tumornahem und tumorfernen Gewebe entnommen. Nach Beendigung dieser Prozessschritte hatte man einen Dot hergestellt. Um eine exakte Zuordnung eines Array-Blocks zu gewährleisten, wurden in diesem Fall Muskelgewebe vom Schwein als Anhaltspunkte eingefügt. Anschließend wurden die hergestellten Dots je nach Fragestellung immunhistochemisch gefärbt (**Abbildung 5**).

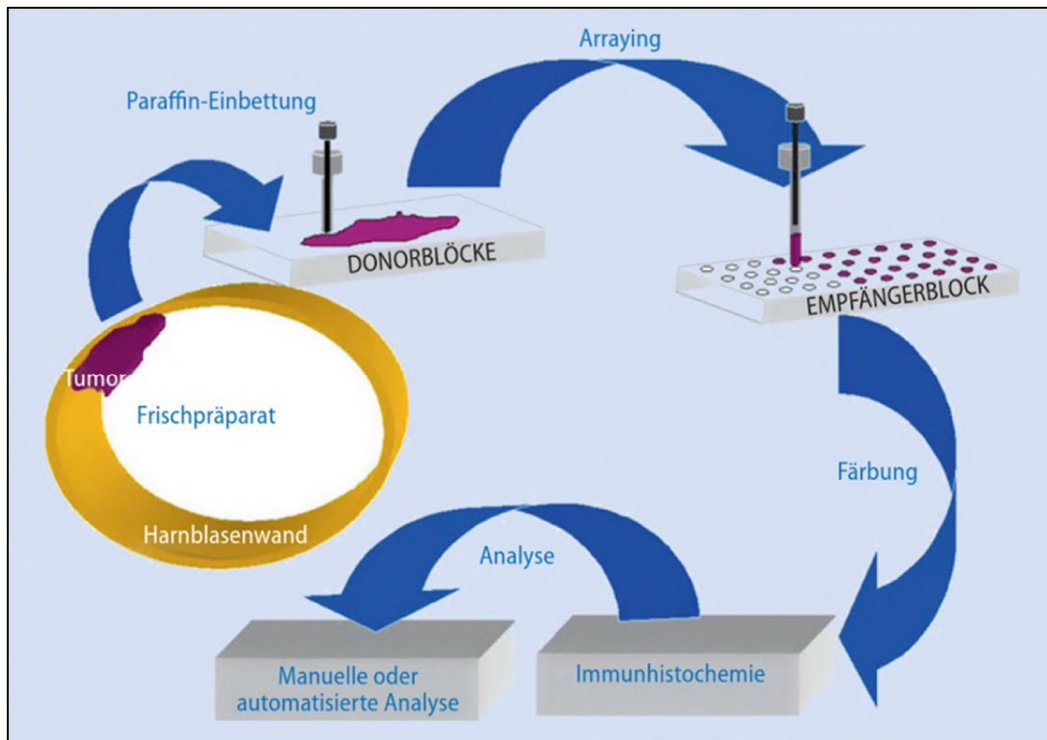


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Prozesses zur Erstellung und Auswertung eines TMA.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1. Allgemeine Aspekte

Das Prinzip der Immunhistochemie stützt sich auf das Lokalisieren bestimmter Strukturen (Antigene) in Gewebeschnitten via Antigen-Antikörper-Bindung. Die Antigen-Antikörperbindung wird mit Hilfe einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Die Antikörper binden an spezifische Epitope in den zu untersuchenden Geweben. So werden je nach Fragestellung spezifische Antikörper ausgewählt. Die Spezifität der Bindung zwischen Antikörper und Epitopen spielt dabei eine entscheidende Rolle, um die Ergebnisse nicht durch weitere/andere Bindungen zu verfälschen. Zur Detektion dieser Antigen-Antikörper-Komplexe wird sich mit Markern beholfen, die zum Beispiel fluoreszierend, radioaktiv sind oder ein Enzym oder kolloidales Gold darstellen können. Hierfür gibt es zwei Methoden: die direkte und die indirekte. Bei der direkten trägt der Primärantikörper bereits das signalerzeugende Molekül und kann somit direkt die entstandene Bindung darstellen. Bei der indirekten Methode müssen weitere Schritte erfolgen um die Bindung zwischen dem Primärantikörper und dem Antigen darzustellen. Beispielsweise wird zusätzlich ein Sekundärantikörper zugegeben, an dem ein Enzym gebunden ist, das mit einem entsprechenden Substrat eine Farbreaktion hervorruft. Diese Reaktion wird nur durch zusätzliche Bindung des Sekundärantikörpers und Primärantikörpers ausgelöst. Somit kann ebenfalls das ursprünglich zu detektierende *Epitop* kenntlich gemacht werden (Kramer 2013).

2.5.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen für AKT und Insulin- β -subunit

Sowohl die AKT, wie auch die Insulin- β -Färbung wurden in den Laborräumen der Klinik für Urologie der Universitätsklinik in Tübingen vorgenommen. Zunächst müssen die Proben auf einen Objektträger aufgebracht werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Fixierung der Proben möglichst flach und faltenfrei abläuft, sonst kann dies eine Fehlerquelle bei der Auswertung darstellen. Bei Vorlage von Paraffinschnitten werden diese aus einem vorgewärmten Wasserbad fixiert und anschließend bei nicht mehr als 60 °C getrocknet. Damit es zu keinen fehlerhaften Färbemustern bei den Immunreaktionen kommt, müssen die Paraffinschnitte zuerst entparaffiniert und rehydriert

werden. Nicht vollständig entferntes Paraffin kann Störungen bei den Immunreaktionen verursachen.

Bei beiden Färbungen verwendete man das Dako REAL™ Detection System unter Verwendung der indirekten immunhistochemischen Färbemethode-ABC.

2.5.2.1 ABC - Methode

Bei der ABC-Methode steht die Abkürzung ABC für den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Das Molekül Avidin hat eine hohe Affinität zu dem Molekül Biotin und ist in der Lage vier Moleküle zu binden. Der Sekundärantikörper trägt über eine kovalente Bindung ebenfalls ein Biotin. Diese kovalente Bindung beeinflusst nicht die Fab-Bindungsstelle und somit die Bindung zum Primärantikörper. Die schlussendlich in Alkohol braune, unlösliche Färbung wird durch eine durch den Sekundärantikörper katalysierte Peroxidasereaktion hervorgerufen (Kramer 2013). Die Zugabe von Wasserstoffperoxid führt zu einem Zerfall der Peroxidase zu Wasser und Sauerstoff. Damit die Reaktion weiterhin abläuft gibt man Chromogen-3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) hinzu. DAB stellt auf der einen Seite dem Enzym die Elektroden zur Verfügung und wird auf der anderen Seite gleichzeitig oxidiert. Dieses Reaktionsprodukt ist als bräunliche Farbe erkennbar (Wolf 2001). Die ABC-Methode wird in **Abbildung 6** vereinfacht erklärt.

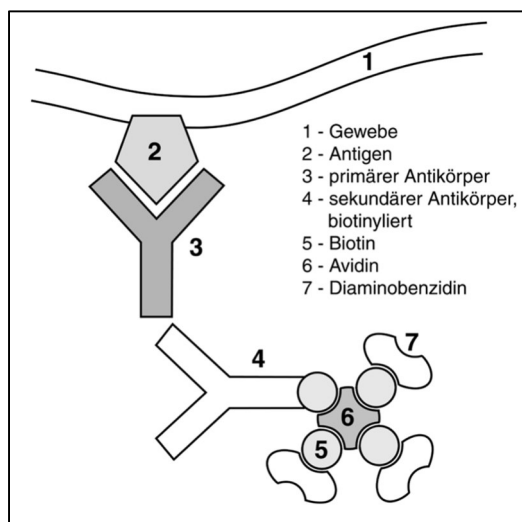


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ABC-Methode (Wolf 2001).

2.5.2.2 Färbeprotokoll AKT und Insulin- β -subunit

Die Entparaffinierung wird mit dem Lösungsmittel reXylo^l 3 x á 10 min durchgeführt. Bei der anschließenden Rehydrierung greift man auf eine angesetzte Alkoholreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen zurück. Angefangen bei 2 x 5 min mit 100 % Ethanol, fortgeführt mit 2 x 5 min mit 96 % und abgeschlossen mit einmalig 5 min mit 70 % Alkohol. Damit wird die unerwünschte Hintergrundfärbung, hervorgerufen durch endogene Peroxidase-Aktivität, reduziert. Anschließend wird 30 min lang mit 3 % Wasserstoffperoxid in destilliertem Wasser inkubiert. In Schritt vier folgt eine Waschung einmalig von 5 min in TBST-Puffer, das besteht aus 0,1 M Tris mit pH 7,6 und 0,15 M NaCl.

Veränderungen in der Struktur des Antigens sind trotz hoch qualitativer Aufbewahrung der Proben möglich. Dies könnte schlussendlich zu einer veränderten oder vollständig aufgehobenen Immunreaktion führen. Die Antigenbindungsstellen können mit einer Hitzebehandlung wiederhergestellt oder verbessert werden. Diese Technik der Demaskierung wurde durch Kochen in 10 mM Citratpuffer mit pH 6,0 15 min in der Mikrowelle und anschließendem 30min langem Abkühlen durchgeführt. Danach folgte ein weiteres Mal eine Waschung mit dem TBST Material, diesmal jedoch 3 x á 5 min.

Im folgenden Schritt wurde das Avidin/Biotin Blocking-Kit von der Firma Vector Blocking-Kit SP-2001 verwendet. Hierbei wurde mit der Avidin Solution 15 min inkubiert, danach 2x á 5 min mit TBST gewaschen und weiterhin folgte eine Inkubation mit Biotin Solution 15 min lang. Danach wird zwei weitere Male á 5 min mit Zuhilfenahme von TBST gewaschen. Dies dient der Auswaschung der bis *dato* nicht gebundenen Antikörper. Der Sinn hinter dieser Prozessabfolge liegt darin die Störsignale, die von endogenen Avidin, Biotin oder Biotin bindenden Proteinen ausgehen, zu minimieren ("Avidin/Biotin Blocking System - BioLegend" 2015).

Nachfolgend kann der Primärantikörper zugegeben werden. Bei der Insulin- β -subunit-Färbung wird der Insulinrezeptor- β in einer Verdünnung hergestellt mit dem gebrauchsfertigen Verdünnungsmedium des Dako REALTM Antibody Diluent von 1:100. Äquivalent hierzu wird bei der panAKT Färbung der Antikörper AKT(pan) in Verdünnung 1:800 mit Hilfe desselben Verdünnungsmediums angewendet. Inkubiert wurde mit den Antikörpern bei 4°C im Kühlschrank über Nacht. Danach wurde 3 x für 5 min mit TBST gewaschen. In Schritt 11 wird 30 min lang bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, der dem Fertigreagenz aus dem Kit entspricht inkubiert. Anschließend wird weitere drei Male gespült, um die überschüssige Lösung zu entfernen. Eine

weitere Inkubation erfolgt 30 min lang mit der Fertigreagenz mit dem darin enthaltenen Streptavidin-Biotin-Komplex und abermals 3 x 5 min Waschungen. Zugabe des Farbsubstrat. Dies setzt sich zusammen aus 1000µl Substratpuffer und 20µl DAB. Hierbei betrag die Inkubationszeit 30 min. Wiederrum wird mit 2 x á 5 min gewaschen, diesmal jedoch mit destilliertem Wasser, das die Farbreaktion beendet.

Danach schloss sich die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer an. Die Beendigung erfolgte nach 20 Sekunden durch 7 minütiges Spülen mit Leitungswasser. Das Leitungswasser führt zu einer pH-Erhöhung und damit zu einer Blaufärbung.

Erneut folgte eine Dehydration zuerst mit Alkohol für 2 x á 3 min mit 96 % und 2 x á 5 min mit 100 % Alkohol, anschließend 3 x á 5 min mit Xylol. Als Abschluss wurde als Sicherung mit Vecta Mount eingedeckt. Ein braunes Farbpigment wurde als Farbergebnis erzielt.

2.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Als Grundvoraussetzung für die Auswertung galt das Vorhandensein unbeschädigter Dots mit Urothelgewebe. Für die mikroskopische Auswertung wird ausschließlich das Urothel betrachtet. Die immunhistochemische Auswertung wurde mittels Mikroskopie semiquantitativ durchgeführt. Beide Färbungen (AKT sowie Insulin- β -subunit) wurden mit Hilfe eines speziell dafür ausgelegten Scanners gescannt. Mit Hilfe des Computerprogramms namens ImageScope erfolgte die Auswertung

Für die Dokumentation der Ergebnisse wurde ein Dateiblatt im Excel-Format erstellt, das genau dem System der Anordnung der TMA's entspricht. Auf dem Datenblatt entspricht je ein Dot einem Tabellenfeld, in das die zugehörige K-Nummer eingefügt wurde. Die Auswertung und Eintragung wurde verblindet und anonymisiert durchgeführt. Erst bei der Übertragung in die Datenbank mit Hilfe der K-Nummer wurden die Ergebnisse der Dots den jeweiligen Patienten zugeordnet.

Zunächst wurden die mikroskopischen Präparate in der Einarbeitungsphase betrachtet, wobei besonders auf das Urothel, die Erkennung von tumorös verändertem Gewebe, die zelluläre Verteilung bezüglich der Färbungen und die Gesamtzellzahl Wert gelegt wurde. Aufgrund der größtenteils homogenen Färbeverteilung bei der AKT- wie auch bei der Insulinrezeptor- β -Färbung konnte die mikroskopische Auswertung der etablierten Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987) verwendet werden. Der Immunreaktive Score berechnet sich aus dem Produkt der Prozentzahl der positiv gefärbten Tumorzellen und der Intensität der Färbung (Remmele and Stegner 1987) (**Tabelle 2**). Um Fehlerquellen zu reduzieren und die Intraobserver-Reliabilität zu erhöhen, wurden die TMA's jeweils zweimal vollständig mikroskopiert ohne die Kenntnis über die vorherig ermittelten Ergebnisse. Bei größeren Abweichungen zwischen den für einen Dot ermittelten Werten, wurde ein drittes Mal nachmikroskopiert, sonst wurde der Mittelwert aus beiden Ergebnissen gebildet. Im Anschluss wurden alle Daten mit Hilfe der K-Nummer in die Datenbank eingetragen.

Tabelle 2: Immunreaktive Score von Remmele und Stegner (Remmele and Stegner 1987).

Färbeintensität	Anteil positiver Tumorzelle	Immunreaktiver Score
0 = keine Färbereaktion	0 = keine positiven Zellen	0 = negativ
1 = schwache Färbereaktion	1 = < 10 % positive Zellen	1-3 = schwach
2 = mäßige Färbereaktion	2 = 10-50 % positive Zellen	4-7 = mäßig
3 = starke Färbereaktion	3 = 51-80 % positive Zellen	8-12 = stark
	4 = > 80 % positive Zellen	

2.6.1 Deskriptive Beschreibung des Färbeverhaltens

Sowohl die Insulinrezeptor- β wie auch die AKT-Färbung zeigte ein ähnliches Anfärbemuster. Aufgrund dessen konnten sie mit Hilfe einheitlicher Evaluationskriterien ausgewertet werden. Bei beiden immunhistochemischen Färbungen wurde ausschließlich das Zytoplasma immunhistochemisch violett gefärbt. Somit wurde bei der Auswertung das Präparat rein zytoplasmatisch betrachtet und den Kernen keine weitere Bedeutung beigemessen. Da in diesem Fall die Dots relativ homogen gefärbt waren, wurde die Färbeintensität im Gesamten betrachtet. Hierfür wurden die Färbeintensitäten in 4 Grade eingeteilt (0 = keine Färbung, 1, 2 und 3 = intensivste Färbung). Die **Abbildung 10** und **Abbildung 11** zeigen die Masterbeispiele für die jeweiligen Intensitäten. Bei der Auswertung wurde mittels Vergleiches zu diesen als Mustervorlage dienenden Dots der immunhistochemischen Färbung die jeweilige Färbeintensität bestimmt. Da in einem Dot gewisse Intensitätsschwankungen zu finden waren und nicht jede Stelle im Urothel die gleiche Färbeintensität aufwies, wurde der Färbegrad mit Hilfe von Prozentangaben bestimmt. Zu diesem Zweck wird das gesamte Urothel gleich 100 % gesetzt. Anschließend kann aus den Prozent- und Färbegraden die mittlere Intensität berechnet werden.

2.7 Aktualisierung des Follow-up's und Erhebung des *Diabetes-Status*

Zusätzlich zur Erhebung des *Diabetes-Status* aller Patienten wurden Follow-up-Untersuchungen bis Juni 2016 ergänzt. Hierfür wurden mittels der elektronischen und archivierte Patientenakten der *Diabetes-Status* erhoben. Besonders wurde auf das Auftreten von Rezidiven oder weiterer Krankheitsbilder, sowie das Versterben von Patienten protokolliert. Die Analyse des *Diabetes-Status* erfolgte durch Sichtung von Arztbriefen, Anästhesieberichten, Medikationsplänen und insbesondere anhand der Pflegeprotokolle. Hierbei wurde vor allem auf Ernährungsprotokolle zurückgegriffen. Falls zusätzliche Informationen bezüglich der *Diabetes-Art* oder –Therapie vorlagen, wurde dies ebenfalls ergänzend in die Datenbank eingefügt.

2.8 Biometrie

Für die biometrische Auswertung wurde das Computerprogramm JMP-13/JMP-14 (SAS Inc. Cary, USA) für MacOS verwendet. Es wurden die statistischen Tests wie die Verteilung, Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test, Spearman Rho, Kaplan-Meier-Diagramm mit univariater und multivariater Cox-Regression verwendet.

Bei der Durchführung wurde ein Test als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ lag. Im Folgenden werden die Tests kurz dargestellt.

Zur Untersuchung der stetigen Daten auf eine vorliegende Normalverteilung wurden die Quantil-Quantil-Diagramme betrachtet. Hier legten lediglich die Diagramme für die IR beta Färbung im Tumorgewebe sowie die Färbung von AKT in Tumor und benignem Gewebe eine Normalverteilung nahe, weshalb zur statistischen Überprüfung Shapiro-Wilks W Test durchgeführt wurde. Dieser bestätigte mit geringer Konfidenz nahezu normalverteilte Werte für IR beta Tu ($p = 0.1510$), IR beta Ben ($p = 0.0842$), AKT tu ($p = 0.0690$) sowie AKT ben ($p = 0.1005$). Da in den sonstigen Daten keine Normalverteilung vorlag, wurden stets parameterfreie Testverfahren angewendet.

2.8.1 Häufigkeitsverteilungen

Anhand der Häufigkeitsverteilungen kann man für den jeweiligen Datensatz das Vorkommen der verschiedenen Variablen berechnen. Hierfür wurden sowohl absolute wie auch relative Häufigkeiten herangezogen.

2.8.2 Wilcoxon-/Kruskal-Wallis -Test

Dieser Test gehört zu den nicht parametrischen Tests. Somit kommt er statistisch zum Einsatz, wenn die Grundvoraussetzungen (parametrische Stichproben) für einen t-Test nicht gegeben sind. Allgemein untersucht er die Signifikanz inwiefern sich die zentralen Tendenzen (Mittelwert, Median) zweier unabhängiger Stichproben unterscheiden.

2.8.3 Ereigniszeitanalyse

Die Veranschaulichung der Ereigniszeitanalyse stellt das Kaplan-Meier-Diagramm dar (Kaplan and Meier 1958). Hierbei wird verglichen ab welcher Zeit ein bestimmtes Ereignis eintritt. Die x-Achse steht für die Zeitdauer und die y-Achse zu welchem Zeitpunkt das Ergebnis eingetreten ist.

Beim Rezidivrisiko wird betrachtet wie viel Prozent der Patienten zu einem gewissen Zeitpunkt ein Rezidiv der Erkrankung haben.

Beim krankheitsspezifischen Überleben (CCS), werden diejenigen Patienten, die aufgrund von anderen Krankheiten verstorben sind aus dem Kollektiv herausgerechnet, um nur diejenigen Patienten zu betrachten, die nicht an der Krebserkrankung oder ihren Folgen gestorben sind.

Das Gesamtüberleben (OS) besagt wie viel Prozent der Menschen, die in einer Studie erfasst wurden, nach Diagnosestellung bis zu einem bestimmten Zeitpunkt noch am Leben sind ("NCI Dictionary of Cancer Terms" 2018).

Als Test, der den absoluten Wert der zu untersuchenden Variablen berücksichtigt, wurde die univariate logistische Regression zur Hilfe genommen. Hierbei wird immer nur eine Variable, das heißt ein linearer Zusammenhang untersucht.

Um bei einer Kaplan-Meier-Kurve Einflüsse, die eine Korrelation beeinflussen rauszurechnen, stützt man sich auf den statistischen Test der multivariaten Cox-Regression. In dieser Studie wurden bei der multivariaten Cox-Regression folgende Einflüsse mit einbezogen: Alter bei Zystektomie, Geschlecht, Tumorstadium, *Grading*, klinisches Stadium der Metastasierung und Lymphknotenstadium.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Studienkollektivs

Nach der Bereinigung der Studienkohorte ergab sich eine Anzahl von 112 Patienten, die als Studienkollektiv betrachtet und statistisch analysiert wurden. Die demographischen Daten sind tabellarisch in der **Tabelle 3** zusammengefasst.

Tabelle 3: Charakterisierung des Patientenkollektivs.

Allgemeine Informationen und klinische Daten des Patientenkollektivs	
Geschlechterverhältnis	26 (23 %): Frauen
	86 (77 %): Männer
Alter bei Zystektomie (Jahre)	Median: 68 Jahre
	Mittelwert: 66 Jahre
	Jüngstes Alter bei OP: 32 Jahre
	Ältestes Alter bei OP: 84 Jahre
Tumorstadien	37 (41 %): \leq T2b
	75 (59 %): $>$ T2b
N-Stadien	67 (60 %): N0
	24 (21 %): N1
	15 (13 %): N2
	2 (2 %): N3
	4 (4 %): N(x)
M-Stadien	99 (88 %): M0
	9 (8 %): M1
	4 (4 %): M(x)
Grading	29 (26 %): G2
	83 (74 %): G3

	Diabetiker	Nicht-Diabetiker	Signifikanz (p-Werte)
Patienten	n = 25 (22 %) n(x): 3 (3 %)	n = 84 (75 %)	
Geschlechterverhältnis	5 (20 %): Frauen 20 (80 %): Männer	19 (23 %): Frauen 65 (77%): Männer	p = 0,61
Tumorstadien	8 (32 %): ≤ T2b 16 (64 %): > T2b 1 (4 %): T(x)	28 (33 %): ≤ T2b 56 (67 %): > T2b	p = 0,41
N-Stadien	20 (80 %): N0 3 (12 %): N1 2 (8 %): N2	45 (54 %): N0 21 (25 %): N1 12 (14 %): N2 2 (2 %): N3 4 (5 %): N(x)	p = 0,01
M-Stadien	21 (84 %): M0 3 (12 %): M1 1 (4 %): M(x)	75 (89 %): M0 6 (7 %): M1 3 (4 %): M(x)	p = 0,75
Grading	7 (28 %): G2 18 (72 %): G3	22 (26 %): G2 62 (74 %): G3	p = 0,43

Diabetesstatus

Von der Studienkohorte hatten zum Zeitpunkt der Zystektomie 25 (28 % in Bezug auf die Gesamtkohorte) Patienten einen bekannten *Diabetes mellitus*. Bei 84 der Patienten dagegen war kein Diabetes bekannt, bei 3 Patienten konnten keine entsprechenden Daten erhoben werden.

Altersverteilung

Das jüngste Patientenalter bei Zystektomie lag bei 32 Jahren, das höchste bei 84 Jahren. Der Mittelwert liegt mit circa 66 Jahren knapp unterhalb des Medians mit 68 Jahren.

Betrachtet man von der Studienkohorte ausschließlich die Diabetiker liegt der Median ebenfalls bei 68 Jahren, der jüngste und der älteste Patient weisen jedoch eine Altersspanne von 55 Jahren auf.

Einteilung der Tumorstadien

T-Stadien

37 Patienten (circa 41 %) wiesen zum Zeitpunkt der Zystektomie ein Tumorstadium \leq T2b (ohne Eindringung ins perivesikale Gewebe) auf. Nach Gruppierung in Diabetiker und nicht-Diabetiker zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,41$).

N-Stadien

Zum Operationszeitpunkt wiesen 62 % keine und 38 % der Patienten Lymphknotenmetastasen auf. Bei 22 % der Patienten lagen singuläre Metastasen in den Lymphknoten des kleinen Beckenbereiches vor; 14 % wiesen dort mehrere Lymphknotenmetastasen auf und 2 % hatten bereits im Bereich der Arteria iliaca communis Lymphknotenmetastasen.

Die Gruppe der nicht-Diabetiker zeigte signifikant häufiger Lymphknotenmetastasen ($p = 0,01$). Insgesamt wiesen von den 25 Diabetikern 5 (20%), von den 80 nicht-Diabetikern 35 (41%) Lymphknotenmetastasen auf.

M-Stadien

8 % des Gesamtkollektivs hatten zum Zeitpunkt der Zystektomie bereits Fernmetastasen; 92 % wiesen keine Hinweise auf Fernmetastasen auf. 6 der 81 nicht-Diabetiker (7,4 %) wiesen Fernmetastasen auf. Von 24 Diabetikern hatten 3 Patienten (12,5 %) Fernmetastasen. Statistisch unterscheiden sich die Gruppen Diabetiker vs. nicht-Diabetiker nicht ($p = 0,75$).

Grading

Es wurden insgesamt 26 % der Tumore als G2 und 74% als G3 klassifiziert. Im Kollektiv der nicht-Diabetikern wurden 22 dem Grading G2 zugeteilt und 62 dem Grading G3 zugeteilt. Bei den Diabetikern war es wie folgt: 7 wurden als G2 auf und 18 als G3 klassifiziert. Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied der Gruppen Diabetiker vs. nicht-Diabetiker gezeigt werden ($p = 0,43$).

3.2 Krankheitsverlauf bei Diabetikern und nicht-Diabetikern

Im Folgenden wird das Outcome der unterschiedlichen Patientenkollektive beleuchtet. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Unterscheidung von Diabetikern und nicht-Diabetikern.

3.2.1 Rezidivfreies Überleben

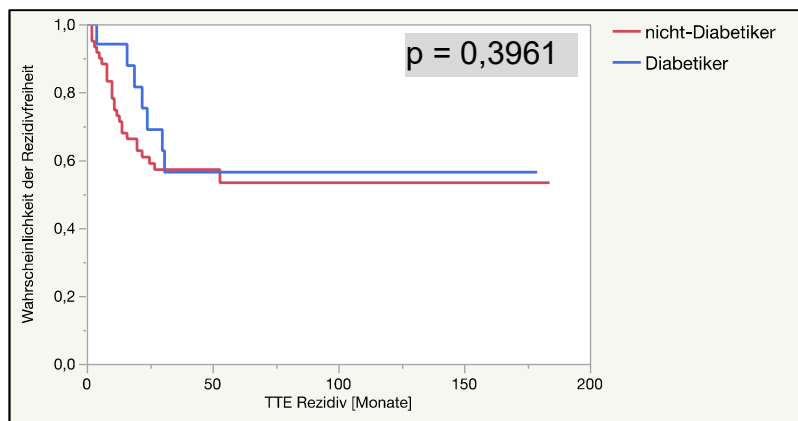


Abbildung 7: Rezidivfreiheit aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.

Die Grafik bezüglich der Rezidivfreiheit zeigt keinen signifikanten Unterschied der Rezidivfreiheit zwischen Diabetikern und nicht-Diabetikern (**Abbildung 7**, Wilcoxon: $p = 0,3916$).

3.2.2 Krankheitsspezifisches Überleben

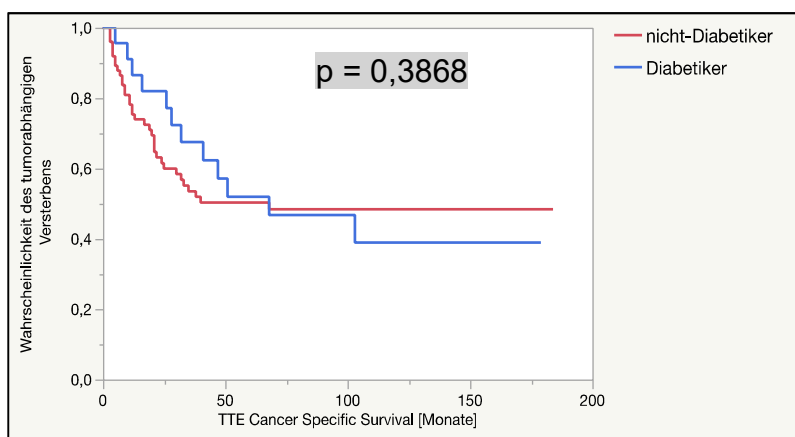


Abbildung 8: Krankheitsspezifisches Überlebens aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.

Das krankheitsspezifische Überleben unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der Gruppe der Diabetiker und nicht-Diabetiker (**Abbildung 8**, Wilcoxon: $p = 0,3868$).

3.2.3 Gesamtüberleben

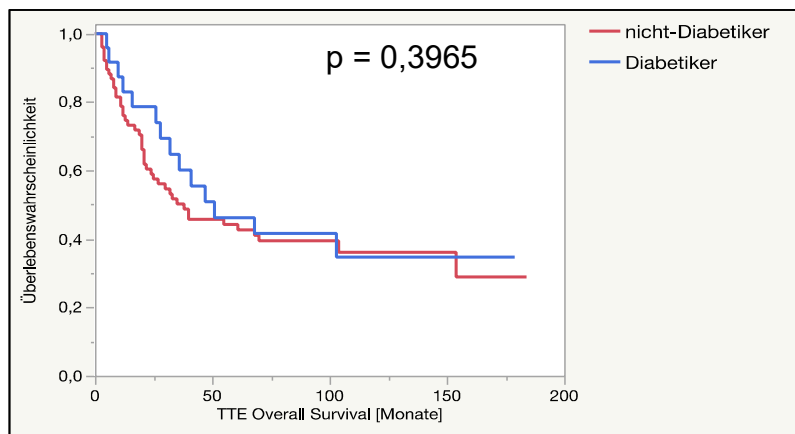


Abbildung 9: Gesamtüberlebensrate aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Gesamtüberlebensrate zwischen den Diabetikern und nicht-Diabetiker (**Abbildung 9**, Wilcoxon: $p = 0,3965$).

3.3 Auswertung des Färbeverhaltens

Neben der Auswertung des Outcomes erfolgte eine histo-pathologische Analyse der Gewebeproben aller Patienten nach Tumorresektion.

Insgesamt wurden 363 Gewebedots von den 112 Patienten gewonnen. Diese wurden für Insulinrezeptor- β , wie auch für AKT immunhistochemisch gefärbt und untersucht. Bei Insulinrezeptor- β konnten 88 nicht auswertbare Dots nicht ausgewertet werden; bei AKT zeigten sich 91 als fehlerhaft. Es zeigte sich bei beiden immunhistochemischen Färbungen eine ausschließlich zytoplasmatische Braunfärbung mit verschiedenen Intensitäten. Die genaue Herangehensweise der Auswertung wurde bereits im Kapitel 2 Material und Methoden erläutert und kann unter dem Unterpunkt nachgelesen werden. Im Folgenden ist die Abstufung des heterogenen Färbeverhaltens mit Hilfe von Bildern für Insulinrezeptor- β (**Abbildung 10**) und für AKT (**Abbildung 11**) veranschaulicht dargestellt.

Abbildung 10: Beispielhaft dargestellte Färbeintensitäten für Insulinrezeptor- β .

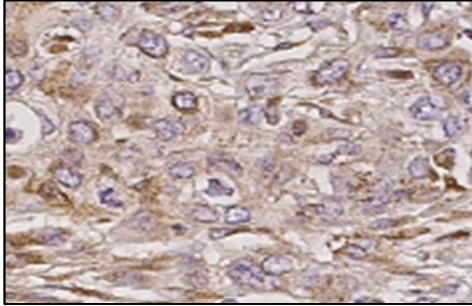
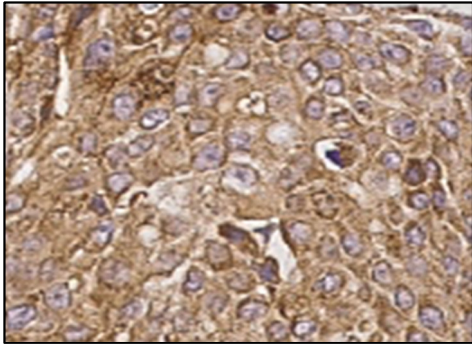
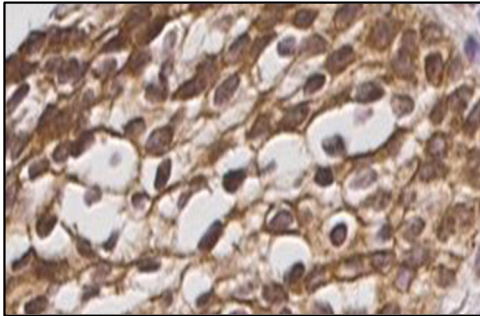
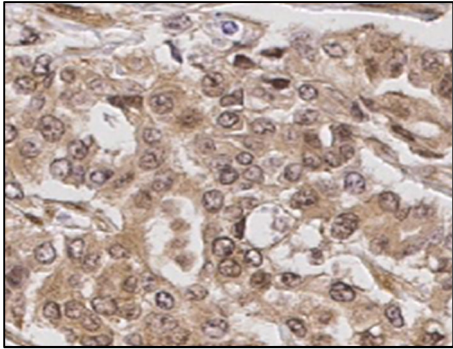
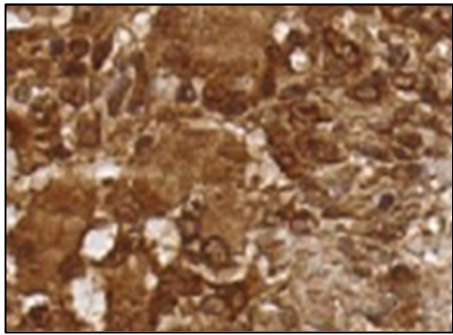
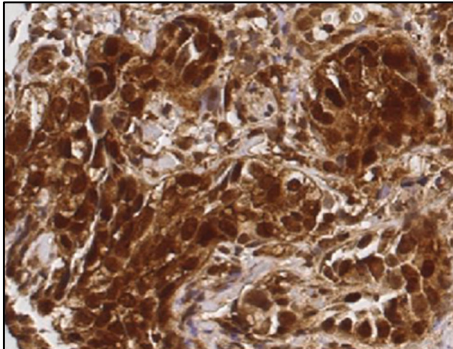
Insulinrezeptor-β	
Schwache Färbung = Punktwerte 0 - 1	
Mäßige Färbung = Punktwerte > 1 - 2	
Starke Färbung = Punktwerte > 2 - 3	

Abbildung 11: Beispielhaft dargestellte Färbeintensitäten für AKT.

AKT	
Schwache Färbung = Punktwerte 0 - 1	
Mäßige Färbung = Punktwerte > 1 - 2	
Starke Färbung = Punktwerte > 2 - 3	

3.4 Insulinrezeptor- β

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Expressionshöhen von Insulinrezeptor- β dargestellt.

3.4.1 Insulinrezeptor- β Tumorgewebe *versus* Insulinrezeptor- β Normalgewebe

Gesamtkollektiv

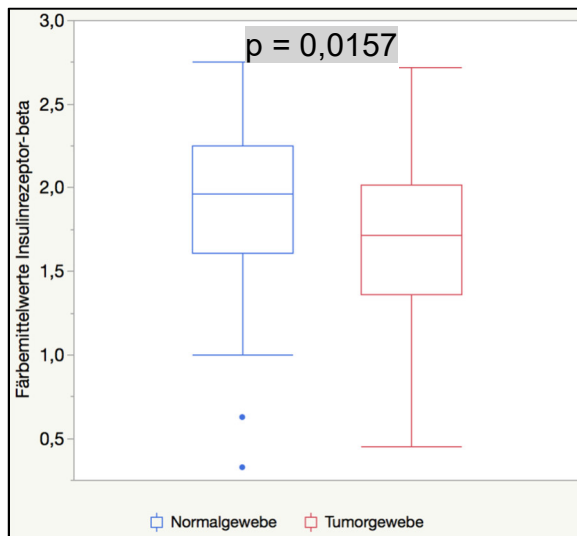


Abbildung 12: Korrelation der Expression des Insulinrezeptors- β zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe.

Unterteilung in Diabetiker und nicht-Diabetiker

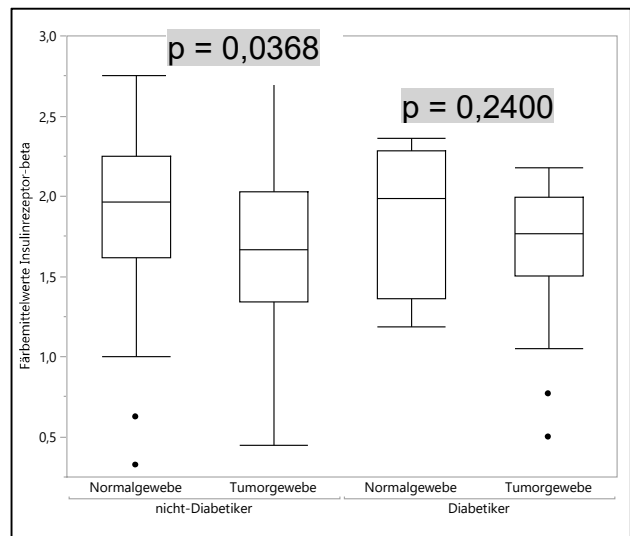


Abbildung 13: Korrelation der Expression des Insulinrezeptors- β zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe aufgeteilt nach Diabetikern und nicht-Diabetikern.

Die Expression des Insulinrezeptors- β unterscheidet sich signifikant zwischen dem Tumorgewebe und dem Normalgewebe (**Abbildung 12:** Korrelation der Expression des Insulinrezeptors- β zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe. **Abbildung 12,** Wilcoxon: $p = 0,0157$). Im Normalgewebe zeigt sich eine höhere Expression von Insulinrezeptor- β im Vergleich zum Tumorgewebe.

Bei Unterteilung des Kollektivs in Diabetiker und nicht-Diabetiker zeigt sich ausschließlich bei den nicht-Diabetikern eine signifikant höhere Expression im Normalgewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe (**Abbildung 13,** Median Tumorgewebe = 1,67; Median Normalgewebe = 1,96; $p = 0,0368$). Bei *Diabetes*-Patienten kann kein signifikanter

Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 13**, Median Tumorgewebe = 1,77; Median Normalgewebe = 1,99; $p = 0,2400$).

3.4.2 Expression des Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch-pathologischer Faktoren

Tumorstadium

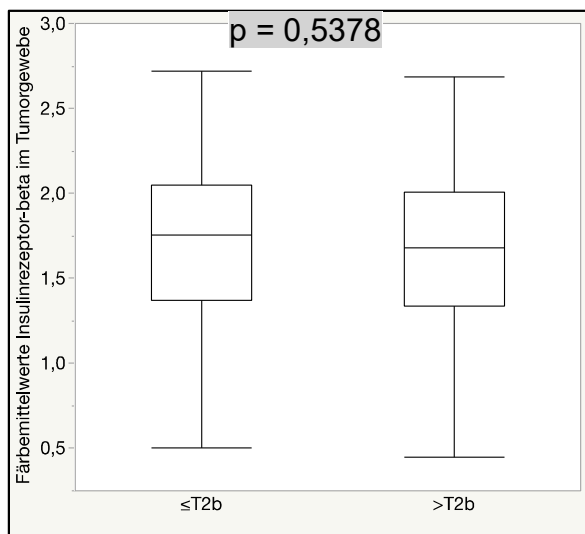


Abbildung 14: Tumorstadium ($T \leq 2b$ und $T > 2b$) im Bezug zu den Färbemittelwerten des Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe.

Klinisches Stadium M0 versus M1

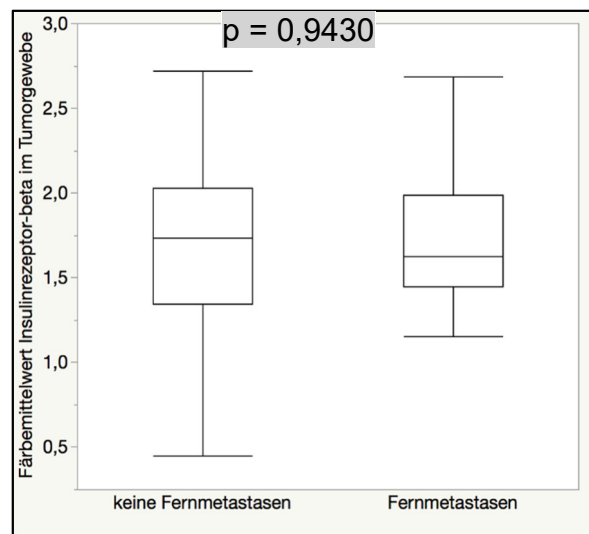


Abbildung 15: Korrelation zwischen dem klinischen Stadium M0 versus M1 und den Färbemittelwerten der Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe.

Die Expression von Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe wurde genauer untersucht im Hinblick auf das Tumorstadium und das klinische Stadium M0 versus M1. Hierbei zeigt sich bei keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied. Das Tumorstadium wird unterteilt in $T \leq 2b$ und $T > 2b$ (**Abbildung 14**, Median: $T \leq 2b = 1,75$; $T > 2b = 1,68$; Wilcoxon: $p = 0,5378$; **Abbildung 15**, Median: M0 = 1,74; M1 = 1,63; Wilcoxon: $p = 0,9430$).

Grading und N-Stadium

Grading

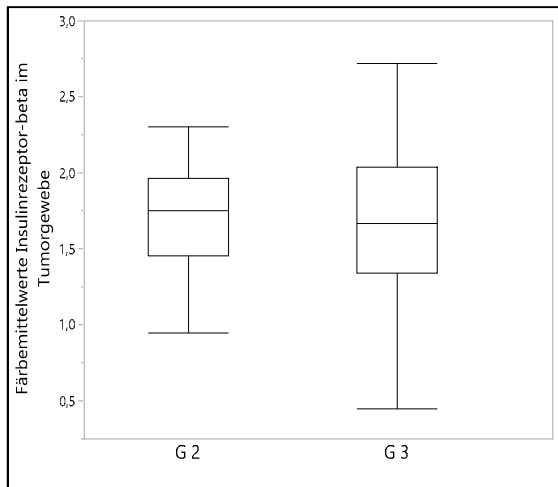


Abbildung 16: Grading (G2 und G3) im Bezug zu den Färbemittelwerten des Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe.

N-Stadium

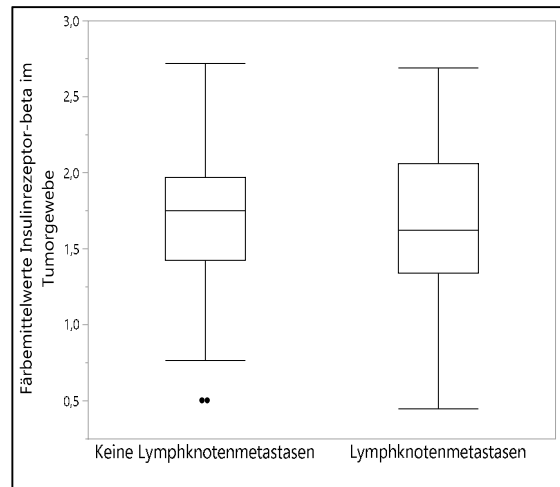


Abbildung 17: N-Stadium (N0 und N1) im Bezug zu den Färbemittelwerten des Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe.

Weiterhin zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Insulinrezeptor- β Expression zwischen G2 und G3 Tumoren (**Abbildung 16**; Median G2 = 1,75; Median G3 = 1,67; $p = 0,8353$), sowie zwischen nicht-Vorliegen (N0) und Vorliegen (N1) von Lymphknotenmetastasen (**Abbildung 17**, Median N0 = 1,75; N1 = 1,62; $p = 0,8241$).

3.4.3 Expression des Insulinrezeptor-β im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch-pathologischer Faktoren bei Diabetikern und nicht-Diabetikern

Tumorstadium

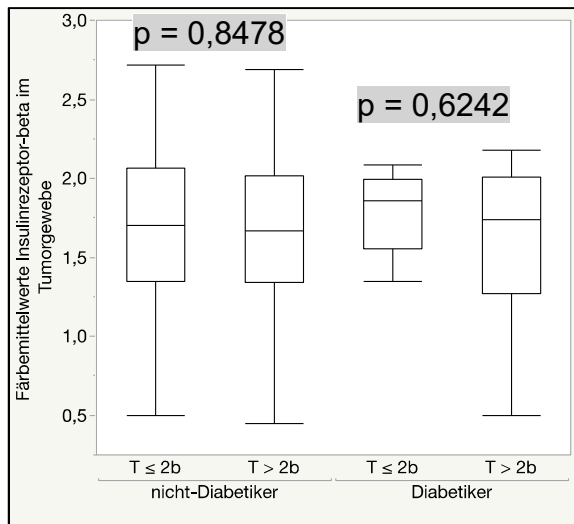


Abbildung 18: Expressionslevel des Insulinrezeptors-β aufgeteilt nach dem Tumorstadium und dem *Diabetes*-Status.

Klinische Stadium M0 versus M1

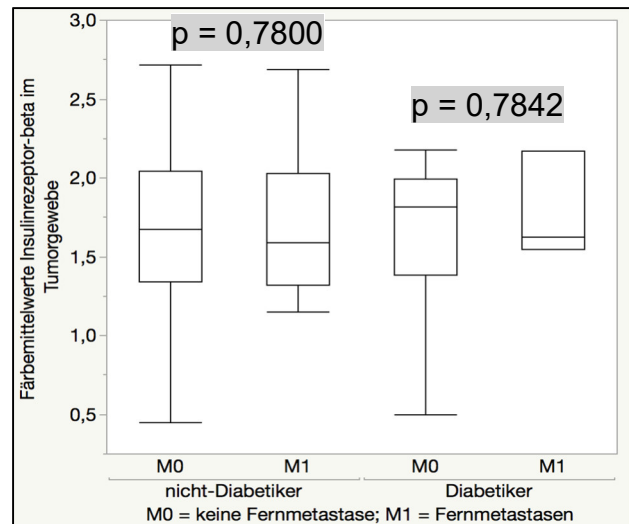


Abbildung 19: Expressionslevel des Insulinrezeptors-β je nach dem klinischen Stadium M0 versus M1 und *Diabetes*-Status.

Das Kollektiv wurde wiederum nach ihrem *Diabetes*-Status unterteilt. Hierbei zeigt sich weder beim untersuchten Tumorstadium (**Abbildung 18**, Diabetiker: Mediane: $T \leq 2b = 1,86$; $T > 2b = 1,74$, Wilcoxon: $p = 0,6242$; nicht-Diabetiker: Mediane: $T \leq 2b = 1,7$; $T > 2b = 1,67$, Wilcoxon: $p = 0,8478$) noch beim klinischen Stadium M0 versus M1 (**Abbildung 19**, Diabetiker: Mediane: $M0 = 1,82$, $M1 = 1,63$; Wilcoxon: $p = 0,7842$; nicht-Diabetiker: Mediane: $M0 = 1,68$, $M1 = 1,59$; Wilcoxon: $p = 0,7800$) ein signifikanter Unterschied.

Grading und N-Stadium

Grading

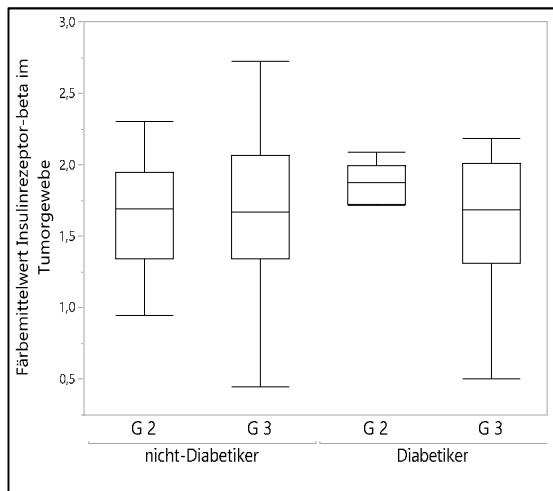


Abbildung 20: Expressionslevel des Insulinrezeptors- β aufgeteilt nach dem Grading und dem *Diabetes*-Status.

N-Stadium

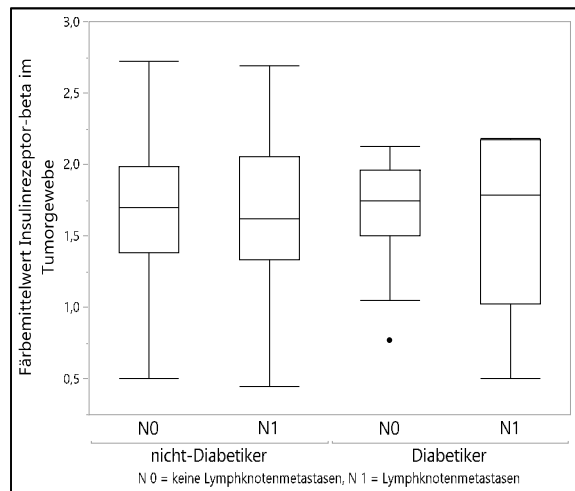


Abbildung 21: Expressionslevel des Insulinrezeptors- β je nach dem klinischen Stadium N0 versus N1 und *Diabetes*-Status.

Weiterhin zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Insulinrezeptor- β Expression zwischen G2 und G3 Tumoren bei Gruppierung in Diabetiker (**Abbildung 20**, Median G2 = 1,88, Median G3 = 1,69; $p = 0,2861$) und nicht-Diabetiker (**Abbildung 20**, Median G2 = 1,69, G3 = 1,67; $p = 0,6001$), sowie zwischen nicht-Vorliegen (N0) und Vorliegen (N1) von Lymphknotenmetastasen bei Diabetikern (**Abbildung 21**, Median N0 = 1,75; N1 = 1,79; $p = 0,6441$) und nicht-Diabetikern (**Abbildung 21**, Median N0 = 1,7; N1 = 1,62; $p = 0,9110$).

3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse Insulinrezeptor-β

Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von Insulinrezeptor-β im Normalgewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe im Gesamtkollektiv sowie im Kollektiv der nicht-Diabetiker (**Abbildung 12** und **Abbildung 13**). Bei Diabetikern findet sich kein statistischer Zusammenhang.

Für die weiteren epidemiologischen sowie klinisch-pathologischen Parameter lassen sich keine signifikanten Ergebnisse erheben. Auch bei Unterteilung des Kollektivs in Diabetiker und nicht-Diabetiker zeigen sich die Unterschiede nicht signifikant.

3.5 AKT

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Expressionshöhen von AKT dargestellt.

3.5.1 AKT Tumorgewebe *versus* AKT Normalgewebe

Gesamtkollektiv

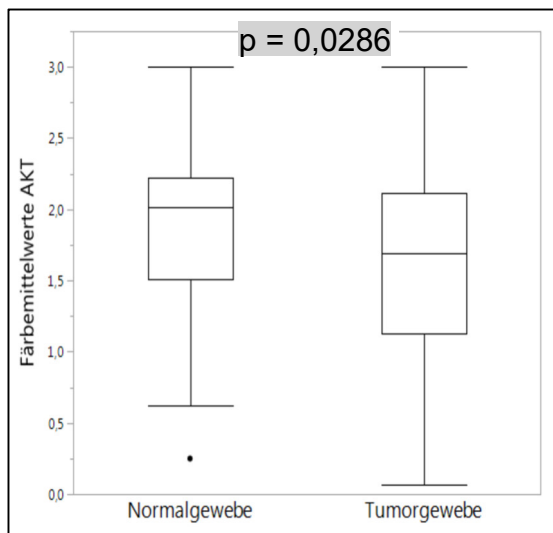


Abbildung 22: Expression von AKT im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe.

Unterteilung in Diabetiker und nicht-Diabetiker

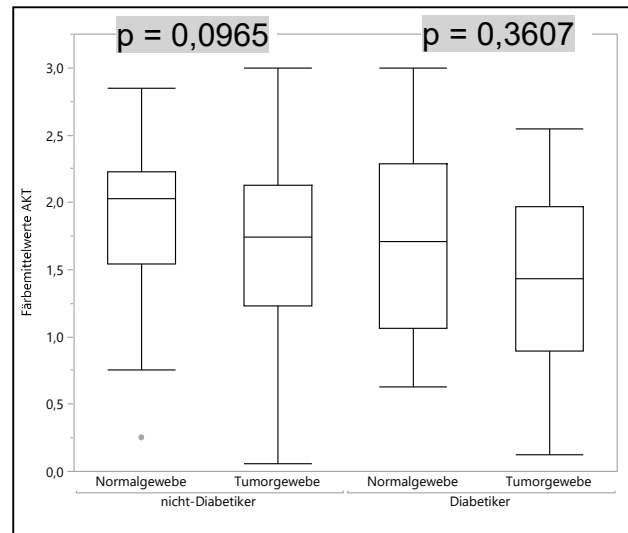


Abbildung 23: Expression von AKT im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe aufgeteilt nach Diabetiker und nicht-Diabetiker.

Die Expressionshöhe von AKT ist im Normalgewebe signifikant höher als im Tumorgewebe (**Abbildung 22**, Median Tumorgewebe = 1,69, Median Normgewebe = 2,01; Wilcoxon: $p = 0,0286$).

Betrachtet man diese Korrelation nach dem *Diabetes*-Status gruppiert, lässt sich kein signifikanter Unterschied mehr feststellen (**Abbildung 23**, Diabetiker: Median Tumorgewebe = 1,43, Median Normalgewebe = 1,71; Wilcoxon: $p = 0,3607$; nicht-Diabetiker: Median Tumorgewebe = 1,74, Median Normalgewebe = 2,03; Wilcoxon: $p = 0,0965$).

3.5.2 Expression AKT im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch - pathologischer Faktoren

Tumorstadium

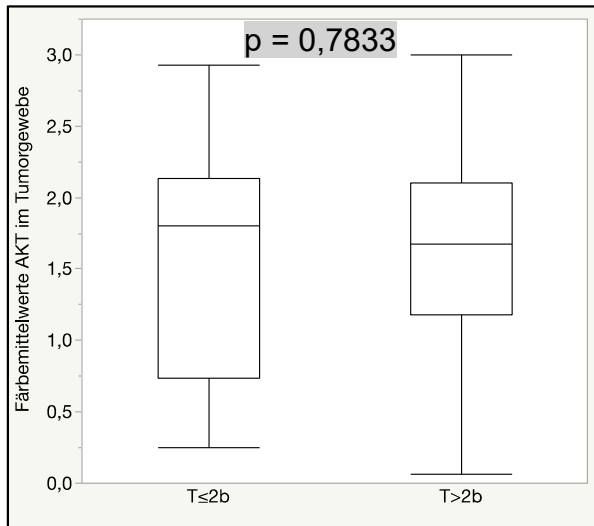


Abbildung 24: Tumorstadium ($T \leq 2b$ und $T > 2b$) im Bezug zu den Färbemittelwerten des AKT im Tumorgewebe.

Klinisches Stadium M0 versus M1

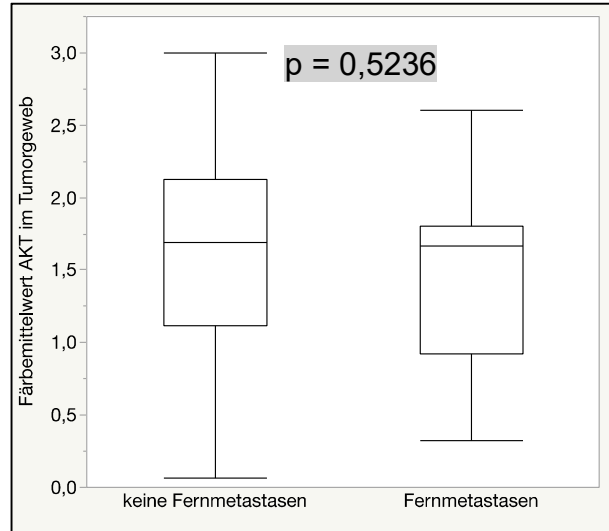


Abbildung 25: Korrelation zwischen dem klinischen Stadium M0 versus M1 und den Färbemittelwerten der AKT-Färbung im Tumorgewebe.

Die Expression von AKT in Tumorgewebe in Bezug auf die klinisch-pathologischen Daten unterscheidet sich bei keiner der oben aufgeführten Kategorien signifikant (**Abbildung 24**, Tumorstadium: Median: $T \leq 2b = 1,81$; $T > 2b = 1,68$; Wilcoxon: $p = 0,7833$; **Abbildung 25**, klinisches Stadium M0 versus M1: Median: $M0 = 1,69$; $M1 = 1,66$; Wilcoxon $p = 0,5236$).

Grading und N-Stadium

Grading

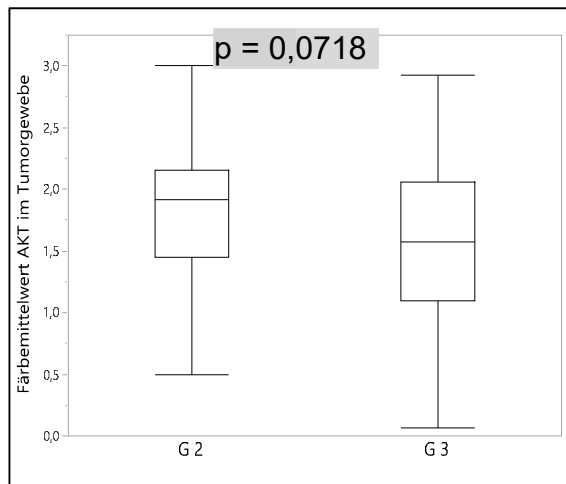


Abbildung 26: Grading (G2 und G3) im Bezug zu den Färbemittelwerten des AKT im Tumorgewebe.

N-Stadium

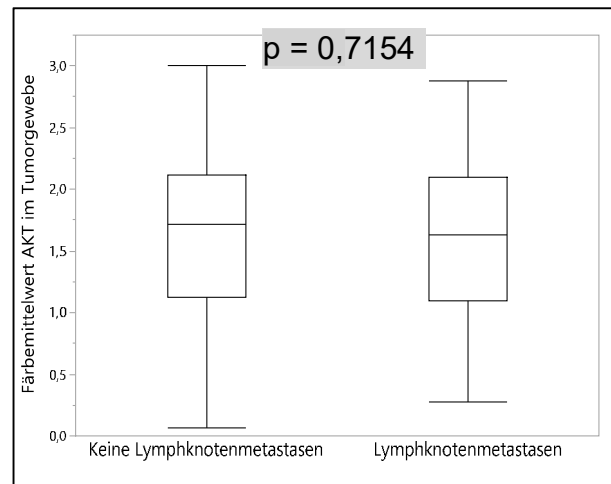


Abbildung 27: Korrelation zwischen dem klinischen Stadium N0 versus N1 und den Färbemittelwerten der AKT-Färbung im Tumorgewebe.

Ebenso zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der AKT Expression zwischen G2 und G3 Tumoren (**Abbildung 26**, Median G2 = 1,91; Median G3 = 1,58; $p = 0,0718$), sowie zwischen nicht-Vorliegen (N0) und Vorliegen (N1) von Lymphknotenmetastasen (**Abbildung 27**, Median N0 = 1,71; N1 = 1,63; $p = 0,7154$).

3.5.3 Expression AKT im Tumorgewebe in Abhängigkeit klinisch-pathologischer Daten bei Diabetikern und nicht-Diabetikern

Tumorstadium

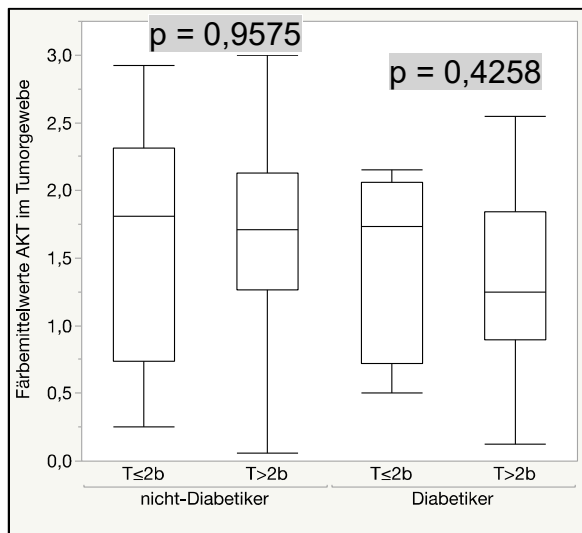


Abbildung 28: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem Tumorstadium und dem *Diabetes*-Status.

Klinisches Stadium M0 versus M1

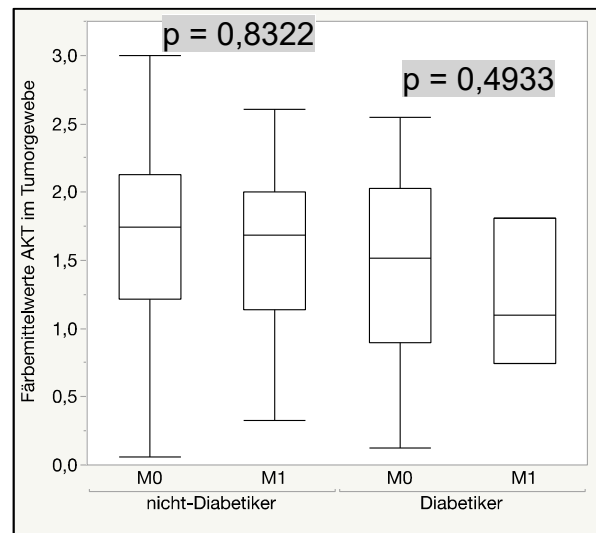


Abbildung 29: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem klinischem Stadium M0 versus M1 und dem *Diabetes*-Status.

Statistisch zeigt sich keine signifikante Korrelation der Expression des AKT in der Gruppierung nach dem *Diabetes*-Status in Bezug auf das Tumorstadium unterteilt in $T \leq 2b$ und $T > 2b$ (**Abbildung 28**, Diabetiker: Mediane: 1,74; 1,25; Wilcoxon: $p = 0,4258$, nicht-Diabetiker: Mediane: 1,81; 1,71; $p = 0,9575$).

Zwischen dem klinischen Stadium M0 versus M1 und der Expressionshöhe von AKT zeigt sich keine signifikante Korrelation sowohl in der Gruppe der Diabetiker als auch in der Gruppe der nicht-Diabetiker (**Abbildung 29**, Diabetiker: Median: M0 = 1,52; M1 = 1,1; Wilcoxon: $p = 0,4933$; nicht-Diabetiker: M0 = 1,74; M1 = 1,69; Wilcoxon: $p = 0,8322$).

Grading und N-Stadium

Grading

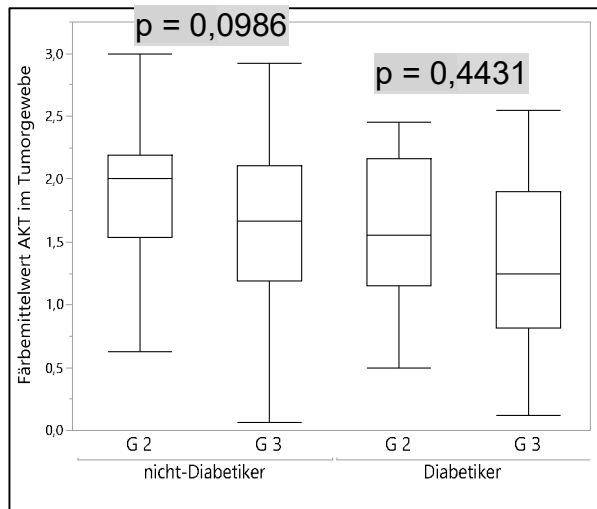


Abbildung 30: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem Grading und dem Diabetes-Status

N-Stadium

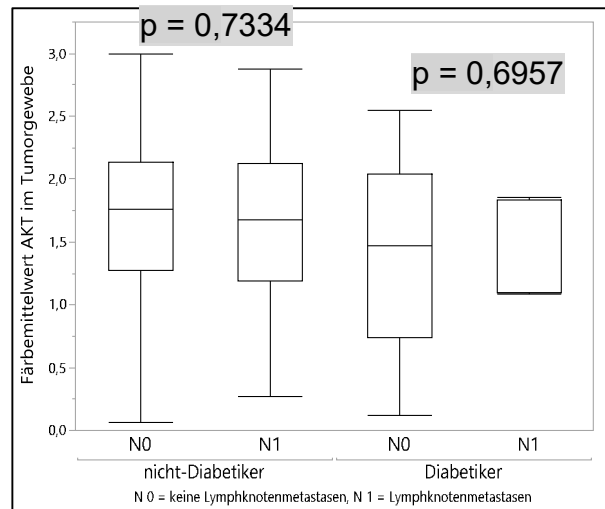


Abbildung 31: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem N-Stadium und dem Diabetes-Status.

Weiterhin zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der AKT Expression zwischen G2 und G3 Tumoren bei Gruppierung in Diabetiker (**Abbildung 30**, Median G2 = 1,56, Median G3 = 1,25; $p = 0,4431$) und nicht-Diabetiker (**Abbildung 30**, Median G2 = 2,01, G3 = 1,66; $p = 0,0986$), sowie zwischen nicht-Vorliegen (N0) und Vorliegen (N1) von Lymphknotenmetastasen bei Diabetikern (**Abbildung 31**, Median N0 = 1,48; N1 = 1,1; $p = 0,6957$) und nicht-Diabetikern (**Abbildung 31**, Median N0 = 1,76; N1 = 1,68; $p = 0,7334$).

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse AKT

Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von AKT im Normalgewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe im Gesamtkollektiv (**Abbildung 29**). Bei Unterteilung in Diabetikern und nicht-Diabetiker findet sich kein statistischer Zusammenhang.

Für die weiteren epidemiologischen sowie klinisch-pathologischen Parameter ergeben sich keine relevanten Zusammenhänge mit der AKT Expression. Auch bei Unterteilung des Kollektivs in Diabetiker und nicht-Diabetiker zeigen sich die Unterschiede nicht signifikant.

3.6 Interaktionen

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Interaktionen zwischen den Expressions-
ergebnissen des AKTs und Insulinrezeptor- β dargestellt.

3.6.1 Insulinrezeptor- β -subunit *versus* AKT im Gesamtkollektiv der Normalgewebe und Tumorgewebe

Normalgewebe

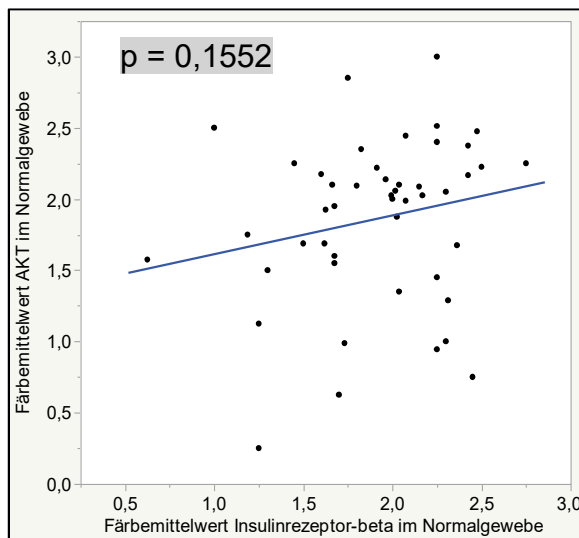


Abbildung 32: Korrelation der
Expression von Insulinrezeptor- β und
AKT im Normalgewebe.

Tumorgewebe

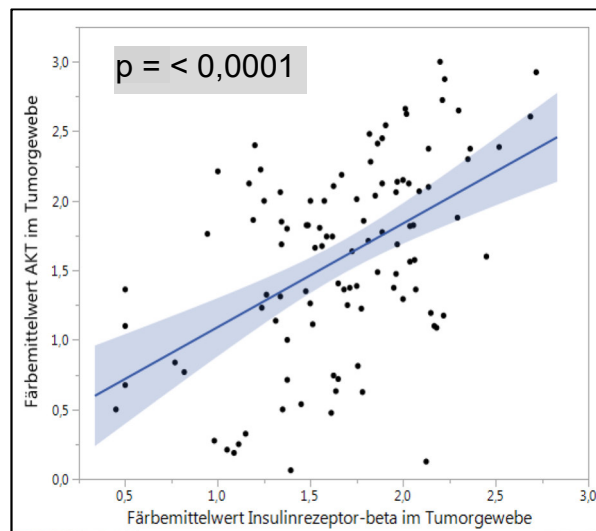


Abbildung 33: Korrelation der
Expression des Insulinrezeptor- β und
AKT im Tumorgewebe.

Anhand der statistischen Auswertung ist kein signifikanter Zusammenhang zwischen
der Expression von Insulinrezeptor- β und AKT in Normalgewebe erkennbar (**Abbil-
dung 32**, Spearman: $\rho = 0,2107$; $p = 0,1552$).

Bei der Untersuchung des Tumorgewebes steigt die Expressionshöhe von AKT signi-
fikant mit der Expressionshöhe des Insulinrezeptors- β . (**Abbildung 33**, Spearman: ρ
 $= 0,4589$; $p = < 0,0001$).

3.6.2 Insulinrezeptor- β vs. AKT bei Diabetikern und nicht-Diabetikern

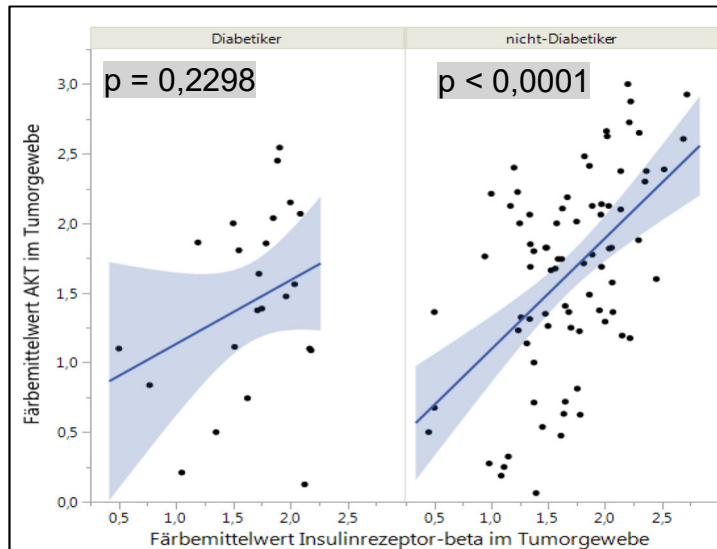


Abbildung 34: Korrelation der Expression des Insulinrezeptor- β und AKT im Tumorgewebe aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.

Bei den nicht-Diabetikern gehen höhere Expressionen von AKT mit höheren Expressionen von Insulinrezeptor- β einher. Bei den Diabetikern zeigt sich hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang (**Abbildung 34**, Diabetiker: Spearman: $\rho = 0,2298$; $p = 0,2915$; nicht-Diabetiker: Spearman: $\rho = 0,4830$; $p < 0,0001$).

3.6.3 Einfluss der Parameter auf die Krankheitsverläufe

Die folgenden Abbildungen zeigen den Einfluss der Parameter (AKT und Insulinrezeptor- β) auf die Krankheitsverläufe.

3.6.3.1 Einfluss von Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe auf den onkologischen Verlauf

Für diese Diagramme wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt und zwar Patienten mit Färbewerten für Insulinrezeptor- $\beta \leq$ und $> 1,7125$. Dieser Wert entspricht dem Median der Insulinrezeptor- β Färbungen und dient in der Analyse als Cut-off.

3.6.3.1.1 Rezidivfreies Überleben

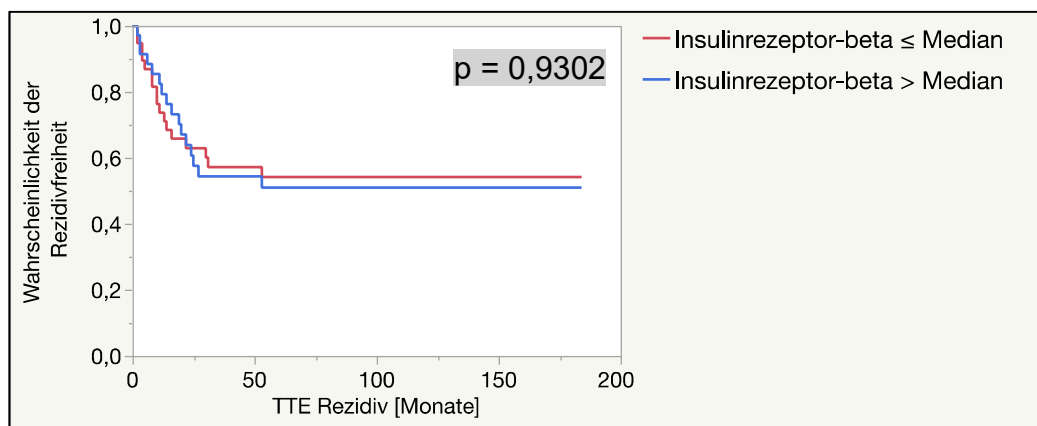


Abbildung 35: Rezidivfreies Überleben – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der Insulinrezeptor- β -Färbung.

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation bezüglich der Rezidivzeit und der Höhe der Insulinrezeptor- β Expression (**Abbildung 35**, Wilcoxon: $p = 0,9302$). In der univariaten Cox-Regression ($p = 0,9222$, HR: 0,0340, [KI: untere 95%: -0,6580; obere 95%: 0,7213]) zeigt sich ebenfalls kein Zusammenhang der Expression mit dem rezidivfreien Überleben.

Des Weiteren wurde der gleichzeitige Einfluss von verschiedenen Variablen auf die Rezidivfreiheit untersucht. Augenmerk wurde auf die Parameter Alter bei Zystektomie, Tumorstadium, *Grading*, klinisches Stadium der Metastasierung (M0 und M1) und Lymphknotenstadium gelegt. Dies wurde mit Hilfe der multivariaten Cox-Regression analysiert. Hier zeigte sich beim Tumorstadium ein signifikanter Einfluss (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Multivariate Cox-Regression der Rezidivfreiheit bei Insulinrezeptor- β -Färbung (unter und oberhalb des Medians).

	HR	Unteres 95 % - KI	p
Expression Insulinrezeptor- β ($\leq 1,7125$)	0,7768	0,3646	0,5129
Tumorstadium (T > T2b)	2,5174	1,0506	0,0276
Lymphknotenstadium (N1)	2,0965	0,9154	0,0849
Metastasierung (M1)	1,1214e-9	0	0,4196
Grading (G3)	1,1431	0,4814	0,7600
Alter bei Zystektomie	1,0348	0,9952	0,0871

3.6.3.1.2 Krankheitsspezifisches Überleben

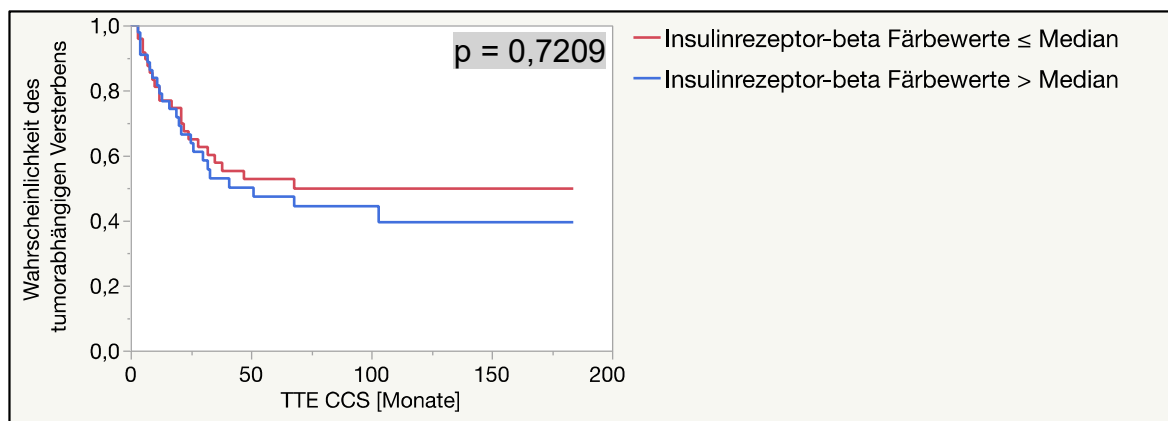


Abbildung 36: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der Insulinrezeptor- β -Expression.

Das krankheitsspezifische Überleben zeigt keine signifikante Korrelation mit der Insulinrezeptor- β Expression (**Abbildung 36**, $p = 0,7209$, Wilcoxon). In der univariaten Cox-Regression zeigt sich die Expressionsstärke von Insulinrezeptor- β im Tumorgewebe auch als nicht signifikanter Einfluss auf die krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit ($p = 0,5836$, HR: 0,1635, [KI: untere 95%: -0,4242; obere 95%: 0,7539]).

Des Weiteren wurde der gleichzeitige Einfluss von verschiedenen Variablen auf die Rezidivfreiheit untersucht. Augenmerk wurde auf die Parameter Alter bei Zystektomie, Tumorstadium, *Grading*, klinisches Stadium der Metastasierung (M0 und M1) und Lymphknotenstadium gelegt. Dies wurde mit Hilfe der multivariaten Cox-Regression

analysiert. Hier zeigte sich beim Tumorstadium, beim klinischen Stadium der Metastasierung, sowie beim Grading ein signifikanter Einfluss (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Multivariate Cox-Regression des krankheitsspezifischen Überlebens bei Insulinrezeptor- β -Färbung (unter und oberhalb des Medians).

	HR	Unteres 95 % - KI	p
Expression Insulinrezeptor- β ($\leq 1,7125$)	0,5230	0,9941	0,0515
Tumorstadium (T > T2b)	2,2070	1,0424	0,0314
Lymphknotenstadium (N1)	1,3727	0,6899	0,3689
Metastasierung (M1)	2,6112	1,0547	0,0497
Grading (G3)	2,677	0,9971	0,0328
Alter bei Zystektomie	1,0285	0,9955	0,0935

3.6.3.1.3 Gesamtüberleben

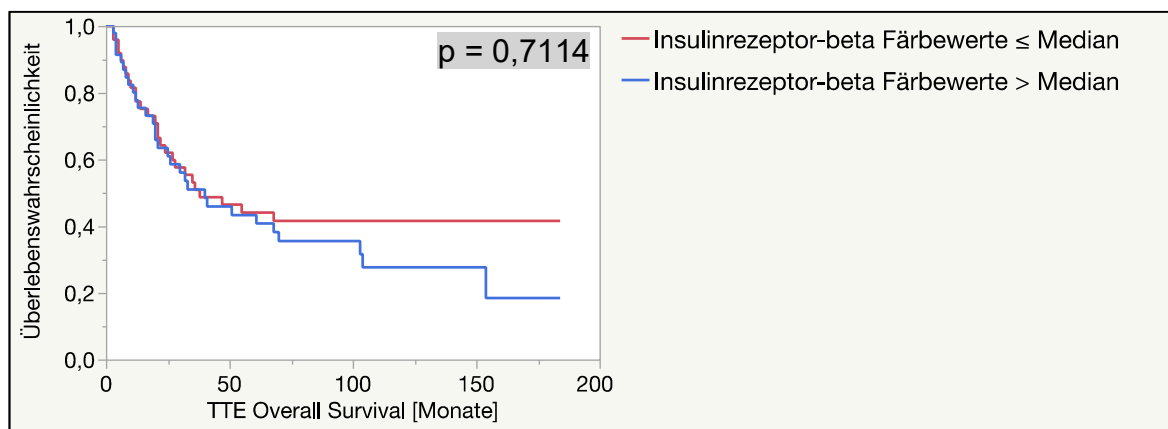


Abbildung 37: Gesamtüberlebensrate – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der Insulinrezeptor- β -Färbung.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe der Insulinrezeptor- β -Expression ($>$ und \leq Median) und dem Gesamtüberleben (**Abbildung 37**, Wilcoxon: $p = 0,7114$). In der univariaten Cox-Regression ($p = 0,4724$, HR: 0,1910, [KI: untere 95%: -0,3311; obere 95%: 0,7177]) kann dies bestätigt werden.

Des Weiteren wurde der gleichzeitige Einfluss von verschiedenen Variablen auf die Rezidivfreiheit untersucht. Augenmerk wurde auf die Parameter Alter bei Zystektomie, Tumorstadium, *Grading*, klinisches Stadium der Metastasierung (M0 und M1) und Lymphknotenstadium gelegt. Dies wurde mit Hilfe der multivariaten Cox-Regression analysiert. Hier zeigte sich beim Tumorstadium sowie beim Alter zum Zeitpunkt der Zystektomie ein signifikanter Einfluss (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Multivariate Cox-Regression der Gesamtüberlebensrate bei Insulinrezeptor- β -Färbung (unter und oberhalb des Medians).

	HR	Unteres 95 % - KI	p
Expression Insulinrezeptor- β ($\leq 1,7125$)	0,5506	0,3054	0,0461
Tumorstadium (T > T2b)	2,6437	1,3390	0,0032
Lymphknotenstadium (N1)	1,5819	0,8501	0,1504
Metastasierung (M1)	2,0730	0,8422	0,1291
Grading (G3)	1,5835	0,7533	0,2110
Alter bei Zystektomie	1,0415	1,0116	0,0054

3.6.3.2 Einfluss von AKT im Tumorgewebe auf den onkologischen Verlauf

Für diese Diagramme wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt und zwar Patienten mit Färbewerten für AKT über und unter 1,6875. Dieser Wert ist der Median der AKT-Färbungen.

3.6.3.2.1 Rezidivzeit

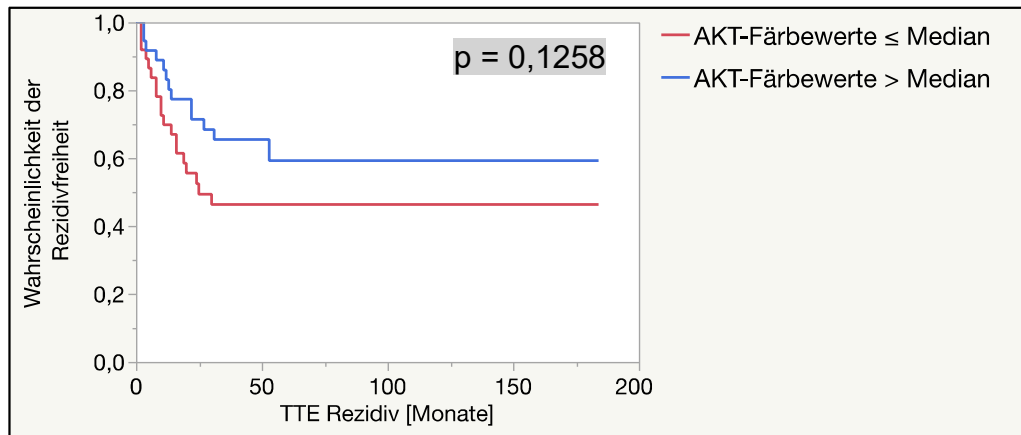


Abbildung 38: Rezidivwahrscheinlichkeit – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der AKT-Färbung.

In dieser Analyse zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Expressionshöhe von AKT und der Rezidivzeit (**Abbildung 38**, Wilcoxon: $p = 0,1258$). In der univariaten Cox-Regression zeigt sich die Expressionshöhe von AKT im Tumorgewebe auch als nicht signifikanter Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit ($p = 0,1750$, HR: $-0,4755$, [KI: untere 95%: $-1,1867$; obere 95%: $0,2114$]).

Des Weiteren wurde der gleichzeitige Einfluss von verschiedenen Variablen auf die Rezidivfreiheit untersucht. Augenmerk wurde auf die Parameter Alter bei Zystektomie, Tumorstadium, Grading, klinisches Stadium der Metastasierung (M0 und M1) und Lymphknotenstadium gelegt. Dies wurde mit Hilfe der multivariaten Cox-Regression analysiert. Hier zeigte sich bei keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Einfluss (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Multivariate Cox-Regression der Rezidivfreiheit bei AKT-Färbung (unter und oberhalb des Medians).

	HR	Unteres 95 % - KI	p
Expression AKT ($\leq 1,6875$)	1,5300	0,9772	0,2019
Tumorstadium (T > T2b)	2,2839	0,9529	0,0503
Lymphknotenstadium (N1)	2,3274	0,9908	0,0551
Metastasierung (M1)	8,6e-10	0	0,3607
Grading (G3)	1,0654	0,4559	0,8833
Alter bei Zystektomie	1,0264	0,9840	0,2307

3.6.3.2.2 Krankheitsspezifisches Überleben

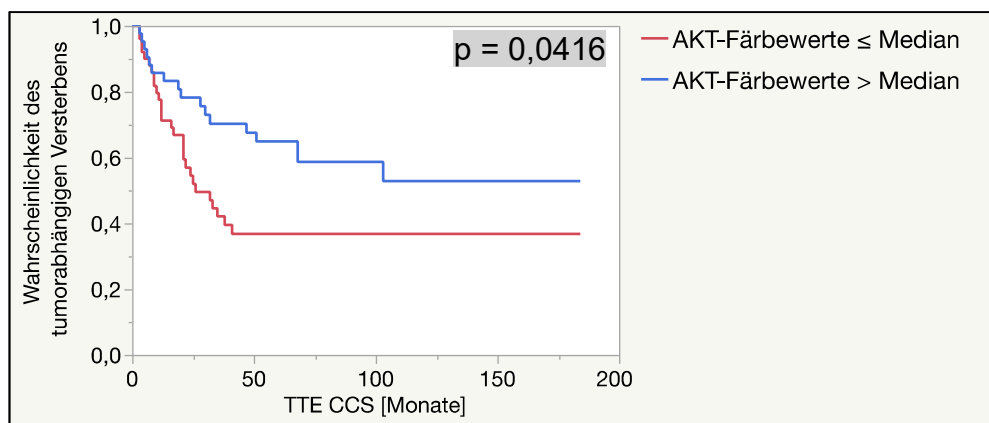


Abbildung 39: Wahrscheinlichkeit des tumorabhängigen Überlebens – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der AKT-Färbung.

Höhere AKT Expressionen gehen mit einem besseren krankheitsspezifischen Überleben als niedrigere AKT Expressionen einher (**Abbildung 39**, Wilcoxon: $p = 0,0416$). Dieser Zusammenhang kann in der univariaten Cox-Regression bestätigt werden ($p = 0,0428$, HR: $-0,6171$, [KI: untere 95%: $-1,2437$; obere 95%: $-0,0200$]).

Des Weiteren wurde der gleichzeitige Einfluss von verschiedenen Variablen auf die Rezidivfreiheit untersucht. Augenmerk wurde auf die Parameter Alter bei Zystektomie, Tumorstadium, *Grading*, klinisches Stadium der Metastasierung (M0 und M1) und

Lymphknotenstadium gelegt. Dies wurde mit Hilfe der multivariaten Cox-Regression analysiert. Hier zeigte sich bei keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Einfluss (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Multivariate Cox-Regression des krankheitsspezifischen Überlebens bei AKT-Färbung (unter und oberhalb des Medians).

	HR	Unteres 95 % - KI	p
Expression AKT ($\leq 1,6875$)	1,4690	0,7492	0,2578
Tumorstadium (T > T2b)	1,8493	0,8931	0,0868
Lymphknotenstadium (N1)	1,6185	0,8112	0,1739
Metastasierung (M1)	2,1908	0,9067	0,0979
Grading (G3)	2,3183	0,8642	0,0710
Alter bei Zystektomie	1,0222	0,9858	0,2256

3.6.3.2.3 Gesamtüberleben

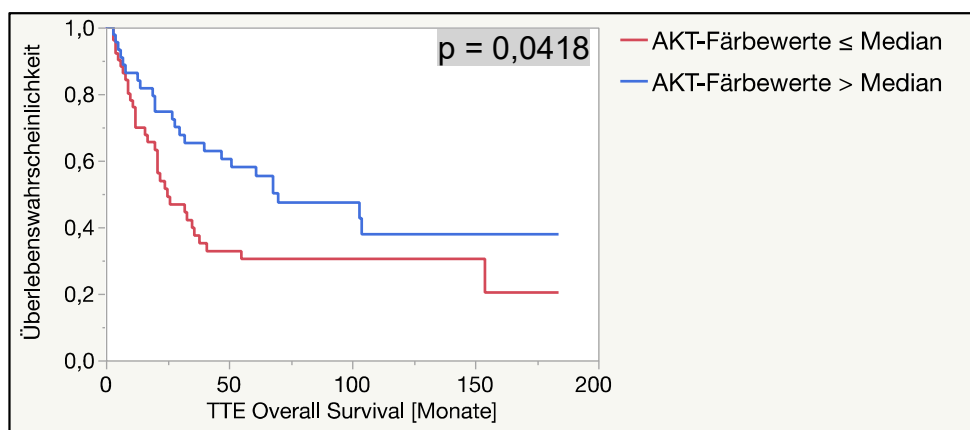


Abbildung 40: Gesamtüberlebensrate – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der AKT-Färbung.

Auch hier gehen höhere AKT-Expressionen mit einem besseren Gesamtüberleben einher als niedrigere Expressionen von AKT (**Abbildung 40**, Wilcoxon: $p = 0,0418$). In

der univariaten Cox-Regression kann dies allerdings nicht bestätigt werden ($p = 0,0627$, HR: -0,4995, [KI: untere 95%: -1,0400; obere 95%: 0,0263]).

Des Weiteren wurde der gleichzeitige Einfluss von verschiedenen Variablen auf die Rezidivfreiheit untersucht. Augenmerk wurde auf die Parameter Alter bei Zystektomie, Tumorstadium, *Grading*, klinisches Stadium der Metastasierung (M0 und M1) und Lymphknotenstadium gelegt. Dies wurde mit Hilfe der multivariaten Cox-Regression analysiert. Hier zeigte sich beim Tumorstadium, sowie beim Alter zum Zeitpunkt der Zystektomie ein signifikanter Einfluss (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Multivariate Cox-Regression der Gesamtüberlebensrate bei AKT-Färbung (unter und oberhalb des Medians).

	HR	Unteres 95 % - KI	p
Expression AKT ($\leq 1,6875$)	1,2609	0,6990	0,4394
Tumorstadium (T > T2b)	2,2457	1,1600	0,0119
Lymphknotenstadium (N1)	1,7967	0,9582	0,0694
Metastasierung (M1)	1,7265	0,7200	0,2383
Grading (G3)	1,4210	0,6776	0,3407
Alter bei Zystektomie	1,0371	1,00548	0,0204

4 Diskussion

4.1 Das Studienkollektiv

Unser Kollektiv aus Harnblasenkarzinompatienten bestand zu 23% aus Frauen und zu 77% aus Männern (**Tabelle 3**). Die publizierte Datenlage bestätigt diese Geschlechterverteilung (Scosyrev et al. 2009)(Heberling et al. 2018). Ähnlich zeigt es sich beim mittleren Erkrankungsalter. Dies liegt laut Literaturrecherche bei 69 Jahren bei Männern und 73,4 Jahren bei Frauen (vom Dorp et al. 2007). Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Zystektomie liegt in diesem Studienkollektiv bei 68 Jahren (**Tabelle 3**).

In diese Studie wurden ausschließlich muskelinfiltrierende Tumore eingeschlossen. Wie erwartet zeigt sich in diesem Kollektiv ein höherer Prozentsatz an T > 2b – Stadien (T ≤ 2b: 41 % und T < 2b: 59 % (**Tabelle 3**)). Die deutsche Krebsgesellschaft berichtet von 76 % der T1 und T2-Stadien bei Frauen, sowie 81 % der T1 und T2-Stadien bei Männern (DKG Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2016). Aufgrund dessen ist die Verteilung der T-Stadien nicht vergleichbar mit Studien, bei welchen alle Harnblasenkarzinome eingeschlossen sind.

Zusammenfassend kann das hier vorliegende Studienkollektiv als repräsentatives Kollektiv für Patienten mit muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinomen angesehen werden.

4.2 Einfluss von *Diabetes* auf das Harnblasenkarzinom

Bei der Analyse des gesamten Patientenkollektivs fällt eine prozentual höhere Anzahl an tumorerkrankten Diabetikern im Gegensatz zur Normalbevölkerung auf (**Tabelle 3**). Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes besteht bei 7,2 % der bundesdeutschen Bevölkerung ein gesicherter *Diabetes mellitus* (RKI and Destatis 2015). In dieser Kohorte litten 23 % der Patienten an einem *Diabetes mellitus* (**Tabelle 3**).

Die positive Korrelation von Krebserkrankungen und *Diabetes mellitus* wurde bereits in mehreren Studien dargestellt. Aufgrund der mitogenen und wachstumsfördernden Wirkung von Insulin machen sich viele Krebsarten die Wirkung von Insulin zunutze (R. Vigneri, Goldfine, and Frittitta 2016). Die Metaanalyse von Zhu et al. beleuchtet 29 Kohortenstudien, die sich mit dieser Korrelation beschäftigen. Von diesen Studien wurden acht in Nordamerika, elf in Europa, acht in Asien und zwei weiteren Ländern durchgeführt. Hiervon zeigten 18 Studien eine Inzidenzsteigerung für das Harnblasenkarzinom bei bestehendem *Diabetes mellitus*. Innerhalb der Studien war eine Heterogenität zu beobachten. Das summierte relative Risiko lag bei 1.29 (Zhu, Zhang, et al. 2013). In der Fallkontrollstudie von Turati et al. setzte sich das Gesamtkollektiv aus 690 Patienten mit Harnblasenkarzinom und 665 Kontrollpatienten zusammen. Es zeigte sich, dass 16,2 % der Patienten mit Harnblasenkarzinom und 8,6 % der Kontrollen an *Diabetes mellitus* erkrankt waren. Das gesteigerte Inzidenzrisiko war gleichbleibend sowohl in den unterschiedlichen Bildungs- wie Altersschichten; bei Frauen, derzeitigen Rauchern und Patienten mit einem BMI < 25 kg/m² ist dies etwas niedriger (Turati et al. 2015). Die Metaanalyse von Zhu et al. wies auf eine Assoziation zwischen *Diabetes mellitus* und Harnblasenkarzinomen hin. Betrachtete man diese Assoziation nach dem Geschlecht zeigte sich ein signifikant erhöhtes Inzidenzrisiko bei der männlichen Bevölkerung. Für diese Feststellung konnten von 36 integrierten Studien, 19 verwendet werden. Bei 14 Studien war das Gesamtkollektiv speziell nach dem Geschlecht aufgeteilt, vier Studien inkludierten nur Männer und eine Studie nur Frauen (Zhu, Wang, et al. 2013). Zusätzlich konnte eine Inzidenzsteigerung bei längerer Dauer der Zuckerkrankheit beobachtet werden (Turati et al. 2015). Newton et al. zeigen in ihrer Studie keine signifikante Inzidenzsteigerung der Gesamtanzahl von Harnblasenkarzinomerkrankungen beim Vorliegen einer *Diabetes mellitus* Erkrankung. Jedoch weisen sie hin auf eine Inzidenzsteigerung von invasiven Harnblasenkarzinomerkrankungen bei Vorliegen einer schweren, länger bestehenden (>15 Jahre) *Diabetes mellitus* Typ II

Erkrankung und dem langjährigen Gebrauch von Insulin (Newton et al. 2013). Fang et al. beschreiben auch eine positive Assoziation zwischen *Diabetes mellitus* und Harnblasenkarzinomen (Fang et al. 2013). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Diabetes mellitus* bei nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen ein unabhängiger Faktor bezüglich des rezidiv- und progressionsfreien Überlebens ist (Hwang et al. 2011). Horsanali et al. beschreiben in Ihrem Studienkollektiv ein signifikant höheres Vorkommen von höhergradigen Tumorstadien und höhergradigem Grading bei Harnblasenkarzinomen bei zusätzlich vorliegender *Diabetes*erkrankung (Horsanali et al. 2016). Lipscombe et al. untersuchten dies anhand eines Mammakarzinomkollektivs. Hier konnte gezeigt werden, dass *Diabetes* für ein fortgeschritteneres Tumorstadium prädisponiert und somit Auswirkungen auf eine höhere Mortalität haben könnte (Lipscombe et al. 2015).

Anhand der heutigen Studienlage wird eine positive Assoziation zwischen *Diabetes mellitus* und dem Aufkommen von Harnblasenkarzinomen deutlich. Anhand dieser Studienergebnisse konnte eine überproportional hohe Anzahl an Diabetikern unter den Patienten mit Harnblasenkarzinomen im Gegensatz zur Allgemeinbevölkerung gezeigt werden.

Anhand unserer Daten wurden keine signifikanten Unterschiede in den klinisch-pathologischen Daten bei Diabetikern versus nicht-Diabetikern festgestellt (**Tabelle 3**).

4.3 Insulinrezeptor- β und das Harnblasenkarzinom

Dem Insulinrezeptor- β wird eine Rolle bei der Tumorentstehung und -progression verschiedener Tumorentitäten zugeschrieben. Hierfür liegt die Desregulierung des Insulinrezeptors bei Tumorerkrankungen zugrunde. Es zeigt sich eine generelle Rezeptorüberexpression, sowie eine vorherrschende Expression der Isoform-A. Allgemein führt dies zu veränderten metabolischen und mitogenen Effekten vor allem bei Krebszellen (Vella et al. 2018). Die metabolischen Effekte werden hauptsächlich durch die Isoform B und die mitogenen Effekte hauptsächlich durch die Isoform A gesteuert (Belfiore et al. 2009). Vor allem die mitogene Antwort der Krebszellen in Bezug zu Insulin und IGF-2 wird verändert (Sciacca et al. 2003). Bis dato ist jedoch die Expression der Insulinrezeptorisoformen nicht vollständig geklärt.

In der hier vorliegenden Studie zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von Insulinrezeptor- β im Normalgewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe (**Abbildung 12**). Bei Unterteilung nach dem *Diabetes*-Status zeigt sich das oben genannte Ergebnis ausschließlich bei den nicht-Diabetikern weiterhin signifikant (**Abbildung 13**).

Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Studie von Wen et al. (Wen et al. 2011). In dieser Arbeit wird eine Vielzahl von möglichen Tumormarkern untersucht. Der Insulinrezeptor zeigt sich hierbei minderexprimiert im Tumorgewebe im Gegensatz zum Normalgewebe.

Im Gegensatz hierzu beschreibt die Studie von Roudnicky et al. eine signifikant erhöhte Expression des Insulinrezeptors in tumor-assoziierten Blutgefäßen bei invasiven Harnblasenkarzinomen (Roudnicky et al. 2017).

Beim Harnblasenkarzinom ist der Insulin-like-growth-factor-1 deutlich mehr erforscht. Es zeigt sich eine Verknüpfung des Insulin-like-growth-factors-1 zum Insulinrezeptor im Insulinsignalweg. Dies ist in **Abbildung 3** ansatzweise dargestellt. In 62 % der untersuchten Urothelkarzinome in der Studie von Gonzalez-Roibon zeigt sich eine Überexpression von Insulin-like-growth-factor-1 (Gonzalez-Roibon et al. 2014). Metallì et al. bestätigten mit ihrer Studie anhand von immunhistochemischen Untersuchungen die Überexpression von Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptoren im Harnblasentumorgewebe im Gegensatz zu Normalgewebe (Metallì et al. 2010). Insbesondere korrelierte diese Überexpression mit einer erhöhten Sterberate (Gonzalez-Roibon et al. 2014).

Eine Überexpression des Insulinrezeptors wird auch bei anderen Malignomen verzeichnet. In einer Studie für Prostatakarzinome von Ofer et al. wird die Rolle des Insulinrezeptors α und β bei der Stimulation des Zellüberlebens beschrieben (Ofer et al. 2015). Weiterhin zeigt sich beispielsweise beim Prostatakarzinom bei einer *in-vitro* Studie eine höhere Zellproliferation und eine geringere Apoptose bei Überexpression von Insulinrezeptor- α (Heidegger et al. 2014). Heni et al. zeigte ebenfalls eine Überexpression der Isoform A im Gegensatz zur Isoform B des Insulinrezeptor- β in Prostatakarzinomgewebe bei nahezu unveränderter Expressionshöhe von Insulinrezeptor- β im Gesamten (Heni et al. 2012). Dies könnte an der hohen Affinität zwischen dem Insulinrezeptor-A sowie dem IGF-II liegen. Frasca et al. konnten eine erhöhte Expression des Insulinrezeptor- α in Tumorgewebe beim Brustkrebs sowie Kolonkarzinom zeigen (Frasca et al. 1999). Im Generellen beschreibt Samani et al. eine erhöhte Tumorprogression und eine schlechtere Prognose bei Überexpression von IGF-Rezeptoren (Samani et al. 2007).

Die Unterschiede zwischen einzelnen Insulinrezeptor- β -Formen sollten für derartige Untersuchungen und Analysen mit bedacht werden. Wie in der Studie von Heni et al. könnte eine erhöhte Expression der Isoform A vorliegen bei ähnlich hoher Gesamtexpression von Insulinrezeptor- β (Heni et al. 2012). Dies zeigt sich ebenfalls in der Studie Jiang et al.. Hier wurde eine erhöhte Expression der Isoform A bei erniedrigter Isoform B bei nicht kleinzelligen Lungentumorerkrankungen beobachtet. Eine Erweiterung der Studie mit Untersuchung der unterschiedlichen Isoformen des Insulinrezeptors in Zukunft wäre wünschenswert.

Weiterhin wurden in unserer Studie die klinisch-pathologischen Parameter mit der Expressionshöhe des Insulinrezeptors- β analytisch korreliert. Hier zeigen sich im vorliegenden Datensatz keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 14, Abbildung 15**). Anhand unserer Ergebnisse ist ein Rückschluss auf eine veränderte Expressionshöhe im Bezug auf die klinisch-pathologischen Parameter nicht möglich. Auch nach Unterteilung des Kollektivs in Diabetiker und nicht-Diabetiker kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 18, Abbildung 19**).

4.4 AKT und das Harnblasenkarzinom

Bereits veröffentlichte Arbeiten belegen den Einfluss von AKT durch nachgeschaltete Signalwege auf die Tumorgenese sowie Tumorprogression. Der PI3K/Akt-Signalweg mit seinen Einflüssen wurde intensiv von Altomare und Testa betrachtet (Altomare and Testa 2005). Somit stellt sich die Frage, ob die Expressionshöhe von AKT mit der Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms korreliert und somit als Progressionsparameter zu werten ist.

In unserer Analyse konnten signifikante Unterschiede zwischen der Expression von AKT im Tumorgewebe zum Normalgewebe festgestellt werden (**Abbildung 22**). Es zeigte sich die Expressionshöhe von AKT im Normalgewebe signifikant höher als im Tumorgewebe. Nach Unterteilung des Kollektivs in Diabetiker versus nicht-Diabetiker kann weiterhin kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 23**).

Lediglich die Studie von Pedregosa et al. (Blanca Pedregosa et al. 2017) zeigte keine signifikant erhöhte Expression von AKT im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe.

In anderen Studien zeigen sich gegensätzliche Ergebnisse. Kumar und Madison zeigten bei Lungen-, sowie Brustkrebs eine erhöhte Apoptoseresistenz und ein verlängertes Tumorzellüberleben bei Geweben mit einem erhöhten Vorkommen von aktiviertem AKT (Kumar and Madison 2005). Studienergebnisse für Mamma-, kolorektales, Lungen-, sowie Ovarialkarzinom zeigen, dass eine somatische Mutation in der Proteinkinase B zu einer erhöhten Aktivierung dieser führt. Dies stellt einen Ansatz dar die wesentliche Rolle von hyperaktiviertem AKT in der Tumorentstehung und -entwicklung zu erklären (Bleeker et al. 2008). Das Fazit der Studie von Sun et. al. war eine Unterdrückung des malignen Tumorverhaltens bei Eingriffen in den AKT-Signalweg (Sun et al. 2018).

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse unserer Studie ist die ausschließliche Untersuchung der Expression des nicht aktivierten AKTs. In verschiedenen Gewebearten zeigen sich unterschiedliche Reaktionsmuster in der AKT-Expression. Einerseits scheinen bestimmte Malignome die Aktivierung des Systems durch Erhöhung des gesamten Proteins AKT und damit auch des relativen Anteils der phosphorylierten Form (pAKT) zu erreichen, zum anderen scheinen andere Malignome hauptsächlich den Anteil von pAKT zu erhöhen (und damit den Teil des unphosphorylierten AKTs zu

verringern). Dies würde erklären, warum in unserem Studienkollektiv AKT in Normalgeweben höher exprimiert wird. Wohlmann et al. beschreiben einen Unterschied in der immunhistochemischen Färbung bei der Betrachtung von AKT gegenüber pAKT. Hier zeigt sich bei humanen glialen Tumoren ein Unterschied in der Stärke der Expression sowie Unterschiede in ihrem Expressionsverhalten nach ihrer zytoplasmatischer und nukleärer Reaktion (Wohlmann, Herzog, and Susanne 2009).

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die Relevanz von AKT vor allem in den Frühstadien einer Tumorerkrankung. In den fortgeschrittenen Stadien könnte AKT seine wesentliche Rolle als Tumormarker verlieren. Andere Tumormarker könnten mitunter die Rolle des aktivierten AKTs übernehmen. Roy et al. beschrieb dieses Phänomen in seiner Studie bezüglich kolorektaler Karzinome (Roy et al. 2002).

Bei der Betrachtung des Expressionslevels von AKT im Tumorgewebe in Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern konnte keine signifikante Wechselbeziehung aufgezeigt werden (**Abbildung 24, Abbildung 25**). Dies wird in den Studie von Costa et al. bestätigt. Auch hier findet sich keine Korrelation zwischen der Expressionshöhe von AKT und dem Tumorstadium (Costa et al. 2015).

Weiterhin zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Diabetikern und nicht-Diabetikern bei Untersuchung der tumorassoziierten Parameter mit der Höhe der AKT-Expression (**Abbildung 28, Abbildung 29**).

4.5 Interaktion von Insulinrezeptor- β und AKT

Der Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und dem Zellstoffwechsel wird in zunehmender Anzahl in der Literatur beschrieben (Shaw 2011). Sowohl die Expression des Insulinrezeptor- β wie auch die Expression der Proteinkinase B scheinen unabhängige Faktoren zu sein, die über die Veränderung des metabolischen Stoffwechsels Einfluss auf die Krebsentstehung und -progression haben (Luo et al. 2018). Weiterhin zeigt sich eine gewisse Abhängigkeit beider Faktoren. AKT kann über den Insulin-signalweg aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der Insulinrezeptorproteine über eine Amplifikation des PI3K zur vermehrten Phosphorylierung und somit Aktivierung von AKT führen kann (Wu et al. 2008, Okada et al. 1994).

Aufgrund dessen haben wir mit Hilfe der Varianzanalyse den Zusammenhang zwischen Insulinrezeptor- β und AKT statistisch beleuchtet.

Ziel dieser Analyse war es die beiden (un-)abhängigen Faktoren in Bezug zueinander zu setzen und ihren gegenseitigen Einfluss zu evaluieren. Hierbei zeigt sich im Tumorgewebe eine signifikante Wechselbeziehung. Je höher die Expression von AKT ist, desto höher ist auch die Expression von Insulinrezeptor- β (**Abbildung 33**).

Eine direkte Wechselbeziehung beim Harnblasenkarzinom wurde bisher nicht erforscht. Diese Tatsache findet sich jedoch beim invasiv-duktalem Mammakarzinom. Hier wurde in der Studie von Luo et al. die Wechselbeziehung zwischen Insulinrezeptor- β und der aktivierten Form von AKT untersucht (Luo et al. 2018).

Die Korrelation zwischen der Expressionshöhe von AKT zur Expressionshöhe von Insulinrezeptor- β wurde erneut nach Unterteilung des Patientenkollektivs in Diabetiker versus nicht-Diabetiker untersucht. Hierbei konnte ausschließlich bei den nicht-Diabetikern eine positive Korrelation (höhere AKT Expressionen gehen mit höheren Insulinrezeptor- β einher) statistisch gezeigt werden (**Abbildung 34**). Ein möglicher Erklärungsansatz wäre der bereits veränderte metabolische Stoffwechsel aufgrund der zugrunde liegenden *Diabetes mellitus* Erkrankung und somit der geringere Aktivierung von AKT über den PI3K-Signalweg. Dies könnte an der sich entwickelnden Insulinresistenz bei Diabetikern liegen. Belfiore et al. beschreiben in ihrer Studie einen vermuteten Anstieg des Verhältnisses zwischen Insulinrezeptor A / Insulinrezeptor B, da die

Isoform B die vorherrschende Form am typischen Zielgewebe von Insulin im menschlichen Körper ist (Belfiore et al. 2009).

4.6 Biomarker des Krankheitsverlaufes

4.6.1 Insulinrezeptor- β als möglicher Marker für die Prognose des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms

Ein Zusammenhang zwischen den Krankheitsverläufen und der Höhe der Insulinrezeptor- β -Expression ließ sich in der vorliegenden Arbeit statistisch nicht beweisen (**Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37**). Gegensätzlich hierzu beschreiben Roudnicky et al. in ihrer Studie eine Überexpression des Insulinrezeptors bei tumor-assoziierten Blutgefäßen einhergehend mit einem signifikant kürzerem progressionsfreiem Intervall sowie Gesamtüberleben.

4.6.2 AKT und Krankheitsverlauf

In der statistischen Analyse der AKT-Expressionen mittels Wilcoxontest findet sich bei höheren AKT-Expressionen ein statistisch signifikant längeres krankheitsspezifisches Überleben und Gesamtüberleben (**Abbildung 39, Abbildung 40**). Ein Zusammenhang der Expressionshöhe von AKT mit der Rezidivwahrscheinlichkeit lässt sich nicht nachweisen (**Abbildung 38**).

In der Studie von Pedregosa et al. wird ein statistisch signifikanter Zusammenhang einer hohen Expression von AKT und einem erhöhten rezidivfreien Überleben bei Harnblasenkarzinomen im Stadium T1 beschrieben (Blanca Pedregosa et al. 2017). Die Studie von Costa et al. zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel und dem krankheitsspezifischen Versterben (Costa et al. 2015).

Gegensätzlich hierzu beschreiben Lue et al. bei der NSCLC Erkrankung bei erhöhten AKT Expressionen eine schlechtere Prognose (Lu et al. 2020). Weiterhin zeigt sich beim hepatuzellulärem Karzinom eine geringeres rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben (Chen et al. 2017).

Ein Erklärungsansatz stützt sich auf den Studienaufbau als immunhistochemische Studie mit der alleinigen Untersuchung des nicht-aktivierten AKTs. Erst bei Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung kann es seinen mitogenen Effekt ausüben. Es wäre denkbar, dass bei der Untersuchung von phosphoriertem AKT eine erhöhte Expression ein geringeres Gesamtüberleben und ein geringeren krankheitsspezifischem

Überleben offenbart. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre wie bereits oben beschrieben der Verlust der Wachstums- und Überlebensregulationsfunktion von AKT bei weiter fortgeschrittenen Tumoren.

4.6.3 Diabetes und Krankheitsverlauf

Bei der Unterscheidung von Diabetikern und nicht-Diabetikern verglichen mit den Überlebensanalysen konnte keine signifikante Korrelation aufgezeigt werden (**Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9**). Als Tendenz zeigt sich im Diagramm der Überlebenswahrscheinlichkeit aufgeteilt nach dem *Diabetes*-Status eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit der Diabetiker im Gegensatz zu den nicht-Diabetikern (**Abbildung 9**). Diese Tendenz korreliert mit der heutigen Studienlage. Die Metaanalyse von Zhu et al. zeigt eine signifikante Assoziation zwischen der Mortalität und *Diabetes* auf, aber nur, wenn für die Analyse Studien herangezogen werden, die unter kontrolliertem Tabakkonsum abgelaufen sind. Hierbei wird deutlich wie wichtig die sorgfältige Auswahl und Untersuchung der Studienkohorte ist. Faktoren, die die Ergebnisse mitbeeinflussen können, müssen bei der Analyse extrahiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist das Rauchen (Zhu, Zhang, et al. 2013). Die Untersuchung von Kwiatkowska et al. zeigt eine Verschlechterung der 1 Jahresüberlebensrate bei Diabetikern nach einer radikalen Zystektomie im Gegensatz zu den nicht-Diabetikern (Kwiatkowska et al. 2017). Oh et al. beschreibt sowohl eine signifikante Verschlechterung der Gesamtüberlebensrate wie auch der krankheitsspezifischen Überlebensrate bei Diabetikern im Gegensatz zu den nicht-Diabetikern (Oh et al. 2015). Diese unterschiedlichen Verläufe zeigten sich statistisch jedoch als nicht signifikant.

4.7 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit folgt einem retrospektiven Forschungsansatz. Dies kann zu verschiedenen Fehlerquellen führen. Im Folgenden sind relevante Fehlerquellen aufgezählt:

- I. Die Studie ist monozentrisch an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt worden. Damit kann eine regionale Patientenselektion einhergehen.
- II. Durch das gewählte Studiendesign werden Daten bezüglich der Behandlung und der Nebenerkrankungen retrospektiv erhoben. Bei jeder Anamnese und Untersuchung werden von Arzt zu Arzt unterschiedliche Prioritäten gesetzt. Damit ist es bei retrospektiven Studien schwierig die Patientendaten in allen Untersuchungsergebnissen zu vergleichen.
- III. Durch die Größe des Patientenkollektivs und die hierdurch relativ gesehen geringen Anzahl an Diabetikern kann es zu einer Verzerrung der Ergebnisse kommen.
- IV. Weiterhin ist die Auswertung semiquantitativ durchgeführt worden. Die Ergebnisse können in einer Reihenfolge sortiert werden, jedoch liegt kein definierter Größenbezug vor.
- V. Weiterhin beruht die mikroskopische Auswertung auf einem subjektiven Eindruck, der die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen kann.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Harnblasentumorpatienten mit und ohne Diabetes mellitus Erkrankung.

Die Analyse erfolgte im ersten Teil anhand klinischer Parameter. Im zweiten Teil wurden die insulinpezifischen Proteine Insulinrezeptor- β und Proteinkinase B (AKT) in Zusammenhang mit der Erkrankung untersucht.

Anhand eines Tissue Microarrays wurden Gewebeproben von 112 Patientinnen und Patienten, die aufgrund eines Harnblasenkarzinoms zystektomiert wurden, untersucht. Immunhistochemisch wurden Insulinrezeptor- β und AKT dargestellt und semiquantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit klinisch-pathologischen Daten und dem *Diabetes*-Status korreliert sowie mit dem individuellen Krankheitsverlauf (Wahrscheinlichkeit des tumorspezifischen Krankheitsversterben = CCS, Gesamtüberlebenschance = OS) uni- und multivariat verglichen.

Das hier untersuchte Kollektiv an Harnblasenkarzinompatienten zeigte einen prozentual höheren Anteil an Diabetikern als in der deutschen Gesamtbevölkerung. Weiter zeigten sich statistisch signifikant mehr Lymphknotenmetastasen bei nicht-Diabetikern.

Insulinrezeptor- β als Beispiel eines Proteinparameters des Insulinsignalweges wurde in signifikant niedrigerer Expressionshöhe im Tumorgewebe im Gegensatz zum Normalgewebe nachgewiesen. Für die Gruppe der nicht-Diabetiker wurde das Ergebnis bestätigt. Bei *Diabetes*-Patienten konnte kein signifikanter Unterschied in der Insulinrezeptor- β Expression festgestellt werden; eine Veränderung im Insulinsignalweg im Sinne einer Insulinresistenz könnte hierbei eine Rolle spielen. Die Korrelation der klinisch-pathologischen Daten mit der Expressionshöhe im Gesamtkollektiv und nach Unterteilung nach dem *Diabetes*-Status ergab keine Auffälligkeiten. Im Vergleich hoher versus niedriger Insulinrezeptor- β Expression im Tumorgewebe zeigten sich keine Unterschiede für die Parameter Gesamtüberleben, krankheitsspezifisches Versterben und Rezidivfreiheit.

In unserer Studie zeigt sich eine signifikant niedrigere AKT-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe. Bei Unterteilung nach dem *Diabetes*-Status

zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der AKT-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Bei der Analyse der klinisch-pathologischen Daten in Bezug zu der AKT-Expression im Gesamtkollektiv und nach Unterteilung nach dem *Diabetes*-Status konnten keine signifikanten Zusammenhänge gezeigt werden. Bei der Untersuchung der Krankheitsverläufe zeigten niedrigere AKT-Expressionen im Tumorgewebe ein signifikant erniedrigtes Gesamtüberleben und höheres krankheitsspezifisches Versterben im Vergleich zu hohen AKT-Expressionen.

In der vorliegenden Studie gingen höhere Insulinrezeptor- β Expressionen mit höheren AKT-Expressionen im Tumorgewebe einher; bei Unterteilung des Kollektivs in Diabetiker und nicht-Diabetiker zeigt sich die oben genannte Korrelation lediglich bei nicht-Diabetikern statistisch signifikant.

Um aus diesen Erkenntnissen Vorteile für die Behandlung von Erkrankten (Progression, Prognose, Behandlung, etc.) zu entwickeln, sollten diese Daten in einem multizentrischen, prospektiven und Tumorstadien-übergreifenden Ansatz an einem großen Patientenkollektiv validiert werden. Ein weiterer Versuchsansatz wäre die Untersuchung der Expressionen von aktiviertem AKT. Hierbei wäre die Frage, ob sich die aktivierte Form pAKT von der Expressionshöhe des nicht aktivierten AKT unterscheidet.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1ab: Histologie der Harnblase (a) aller Schichten und (b) des Übergangsepithels (Uni Halle-Wittenberg, download 2017).....	9
Abbildung 2ab: Struktur des Insulinrezeptors auf der Zelloberfläche (Gorden et al. 1989) (a) und schematische Darstellung des humanen Insulinrezeptors, cDNA (Gorden et al. 1989) (b).....	25
Abbildung 3: Signalkaskade des Insulinsignalweges. (Taniguchi, Emanuelli, and Kahn 2006). Die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor (IR) ist in blau, die daraufhin ausgelösten Signalkaskaden in lila und die Endeffekte in grün dargestellt.....	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Proteinkinase B (Kumar and Madison 2005).....	27
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Prozesses zur Erstellung und Auswertung eines TMA.	37
Abbildung 6: Schematische Darstellung der ABC-Methode (Wolf 2001).....	39
Abbildung 7: Rezidivfreiheit aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.....	50
Abbildung 8: Krankheitsspezifisches Überlebens aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.....	50
Abbildung 9: Gesamtüberlebensrate aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.	51
Abbildung 10: Beispielhaft dargestellte Färbeintensitäten für Insulinrezeptor- β	53
Abbildung 11: Beispielhaft dargestellte Färbeintensitäten für AKT.....	54
Abbildung 12: Korrelation der Expression des Insulinrezeptors- β zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe.....	55
Abbildung 13: Korrelation der Expression des Insulinrezeptors- β zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe aufgeteilt nach Diabetikern und nicht-Diabetikern.....	55

Abbildung 14: Tumorstadium (T ≤ 2b und T < 2b) im Bezug zu den Färbemittelwerten des Insulinrezeptor-β im Tumorgewebe.	56
Abbildung 15: Korrelation zwischen dem klinischen Stadium M0 versus M1 und den Färbemittelwerten der Insulinrezeptor-β im Tumorgewebe.	56
Abbildung 16: Grading (G2 und G3) im Bezug zu den Färbemittelwerten des Insulinrezeptor-β im Tumorgewebe.	57
Abbildung 17: N-Stadium (N0 und N1) im Bezug zu den Färbemittelwerten des Insulinrezeptor-β im Tumorgewebe.	57
Abbildung 18: Expressionslevel des Insulinrezeptors-β aufgeteilt nach dem Tumorstadium und dem <i>Diabetes</i> -Status.	58
Abbildung 19: Expressionslevel des Insulinrezeptors-β je nach dem klinischen Stadium M0 versus M1 und <i>Diabetes</i> -Status.	58
Abbildung 20: Expressionslevel des Insulinrezeptors-β aufgeteilt nach dem Grading und dem <i>Diabetes</i> -Status.	59
Abbildung 21: Expressionslevel des Insulinrezeptors-β je nach dem klinischen Stadium N0 versus N1 und <i>Diabetes</i> -Status.	59
Abbildung 22: Expression von AKT im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe.	61
Abbildung 23: Expression von AKT im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe aufgeteilt nach Diabetiker und nicht-Diabetiker.	61
Abbildung 24: Tumorstadium (T ≤ 2b und T < 2b) im Bezug zu den Färbemittelwerten des AKT im Tumorgewebe.	62
Abbildung 25: Korrelation zwischen dem klinischen Stadium M0 versus M1 und den Färbemittelwerten der AKT-Färbung im Tumorgewebe.	62
Abbildung 26: Grading (G2 und G3) im Bezug zu den Färbemittelwerten des AKT im Tumorgewebe.	63

Abbildung 27: Korrelation zwischen dem klinischen Stadium N0 versus N1 und den Färbemittelwerten der AKT-Färbung im Tumorgewebe.....	63
Abbildung 28: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem Tumorstadium und dem Diabetes-Status.....	64
Abbildung 29: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem klinischem Stadium M0 versus M1 und dem Diabetes-Status.....	64
Abbildung 30: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem Grading und dem Diabetes-Status.....	65
Abbildung 31: Expressionslevel des AKT aufgeteilt nach dem N-Stadium und dem Diabetes-Status.....	65
Abbildung 32: Korrelation der Expression von Insulinrezeptor- β und AKT im Normalgewebe.	67
Abbildung 33: Korrelation der Expression des Insulinrezeptor- β und AKT im Tumorgewebe.	67
Abbildung 34: Korrelation der Expression des Insulinrezeptor- β und AKT im Tumorgewebe aufgeteilt in Diabetiker und nicht-Diabetiker.	68
Abbildung 35: Rezidivfreies Überleben – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der Insulinrezeptor- β -Färbung.	69
Abbildung 36: Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der Insulinrezeptor- β -Expression.....	70
Abbildung 37: Gesamtüberlebensrate – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der Insulinrezeptor- β -Färbung.....	71
Abbildung 38: Rezidivwahrscheinlichkeit – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der AKT-Färbung.....	73
Abbildung 39: Wahrscheinlichkeit des tumorabhängigen Überlebens – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der AKT-Färbung.....	74

Abbildung 40: Gesamtüberlebensrate – Vergleich zwischen Patienten über und unterhalb des Medians der AKT-Färbung..... 75

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation vereinfacht.....	12
Tabelle 2: Immunreaktive Score von Remmele und Stegner (Remmele and Stegner 1987).....	43
Tabelle 3: Charakterisierung des Patientenkollektivs.	47
Tabelle 4: Multivariate Cox-Regression der Rezidivfreiheit bei Insulinrezeptor- β -Färbung (unter und oberhalb des Medians).	69
Tabelle 5: Multivariate Cox-Regression des krankheitsspezifischen Überlebens bei Insulinrezeptor- β -Färbung (unter und oberhalb des Medians).....	71
Tabelle 6: Multivariate Cox-Regression der Gesamtüberlebensrate bei Insulinrezeptor- β -Färbung (unter und oberhalb des Medians).....	72
Tabelle 7: Multivariate Cox-Regression der Rezidivfreiheit bei AKT-Färbung (unter und oberhalb des Medians).	74
Tabelle 8: Multivariate Cox-Regression des krankheitsspezifischen Überlebens bei AKT-Färbung (unter und oberhalb des Medians).	75
Tabelle 9: Multivariate Cox-Regression der Gesamtüberlebensrate bei AKT-Färbung (unter und oberhalb des Medians).....	76

8 Literaturverzeichnis

“2012-EAU-Pocket-Guidelines-on-Non-Muscle-Invasive-Bladder-Cancer.Pdf.” n.d. Accessed March 27, 2019. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/2012-EAU-Pocket-Guidelines-on-Non-muscle-invasive-Bladder-Cancer.pdf>.

Aggen, David H., and Charles G. Drake. 2017. “Biomarkers for Immunotherapy in Bladder Cancer: A Moving Target.” *Journal for Immunotherapy of Cancer* 5 (November). <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0299-1>.

Altomare, Deborah A., and Joseph R. Testa. 2005. “Perturbations of the AKT Signaling Pathway in Human Cancer.” *Oncogene* 24 (50): 7455–64. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209085>.

American Cancer Society. n.d. “Bladder Cancer Stages.” Accessed February 9, 2017. <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>.

Apolo, Andrea B., Jeffrey R. Infante, Ani Balmanoukian, Manish R. Patel, Ding Wang, Karen Kelly, Anthony E. Mega, et al. 2017. “Avelumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, In Patients With Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma: Results From a Multicenter, Phase Ib Study.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (19): 2117–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.6795>.

“Avidin/Biotin Blocking System - BioLegend.” 2015. March 27, 2015. <http://www.biolegend.com/avidin-biotin-blocking-system--11172.html>.

Babjuk, Marko, Andreas Böhle, Maximilian Burger, Otakar Capoun, Daniel Cohen, Eva M. Compérat, Virginia Hernández, et al. 2017. “EAU Guidelines on Non–Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016.” *European Urology* 71 (3): 447–61. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.05.041>.

Babjuk, Marko, Willem Oosterlinck, Richard Sylvester, Eero Kaasinen, Andreas Böhle, Juan Palou-Redorta, and Morgan Rouprêt. 2011a. “EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder.”

-
- 2011b. "EAU Guidelines on Non–Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update." *European Urology* 59 (6): 997–1008. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.03.017>.
- Balar, A., J. Bellmunt, P. H. O'Donnell, D. Castellano, P. Grivas, J. Vuky, T. Powles, et al. 2016. "Pembrolizumab (Pembro) as First-Line Therapy for Advanced/Unresectable or Metastatic Urothelial Cancer: Preliminary Results from the Phase 2 KEYNOTE-052 Study." *Annals of Oncology* 27 (suppl_6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw435.25>.
- Balar, Arjun V., Matthew D. Galsky, Jonathan E. Rosenberg, Thomas Powles, Daniel P. Petrylak, Joaquim Bellmunt, Yohann Loriot, et al. 2017. "Atezolizumab as First-Line Treatment in Cisplatin-Ineligible Patients with Locally Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma: A Single-Arm, Multicentre, Phase 2 Trial." *Lancet (London, England)* 389 (10064): 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32455-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32455-2).
- Barone, Bethany B., Hsin-Chieh Yeh, Claire F. Snyder, Kimberly S. Peairs, Kelly B. Stein, Rachel L. Derr, Antonio C. Wolff, and Frederick L. Brancati. 2008. "Long-Term All-Cause Mortality in Cancer Patients With Preexisting Diabetes Mellitus." *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 300 (23): 2754–64. <https://doi.org/10.1001/jama.2008.824>.
- Belfiore, Antonino, Francesco Frasca, Giuseppe Pandini, Laura Sciacca, and Riccardo Vigneri. 2009. "Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease." *Endocrine Reviews* 30 (6): 586–623. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0047>.
- Bellacosa, A., D. de Feo, A. K. Godwin, D. W. Bell, J. Q. Cheng, D. A. Altomare, M. Wan, et al. 1995. "Molecular Alterations of the AKT2 Oncogene in Ovarian and Breast Carcinomas." *International Journal of Cancer* 64 (4): 280–85.
- Bellacosa, A., J. R. Testa, S. P. Staal, and P. N. Tsichlis. 1991. "A Retroviral Oncogene, Akt, Encoding a Serine-Threonine Kinase Containing an SH2-like Region." *Science (New York, N.Y.)* 254 (5029): 274–77.
- Bellmunt, J., S. A. Mullane, L. Werner, A. P. Fay, M. Callea, J. J. Leow, M. E. Taplin, et al. 2015. "Association of PD-L1 Expression on Tumor-Infiltrating Mononuclear Cells and Overall Survival in Patients with Urothelial Carcinoma." *Annals of Oncology: Official*

Journal of the European Society for Medical Oncology 26 (4): 812–17.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdv009>.

Bellmunt, Joaquim, Ronald de Wit, David J. Vaughn, Yves Fradet, Jae-Lyun Lee, Lawrence Fong, Nicholas J. Vogelzang, et al. 2017. “Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma.” *The New England Journal of Medicine* 376 (11): 1015–26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613683>.

Benninghoff, A., Detlev Drenckhahn, and Wolfgang Zenker. 1993. *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie Und Histologie Des Menschen*. 15. Auflage. Urban und Schwarzenberg.

Bier, Simone, Jörg Hennenlotter, Michael Esser, Sarah Mohrhardt, Steffen Rausch, Christian Schwentner, Moritz Maas, et al. 2018. “Performance of Urinary Markers for Detection of Upper Tract Urothelial Carcinoma: Is Upper Tract Urine More Accurate than Urine from the Bladder?” *Disease Markers* 2018: 5823870. <https://doi.org/10.1155/2018/5823870>.

“Biochemical and Cellular Properties of Insulin Receptor Signalling | Nature Reviews Molecular Cell Biology.” n.d. Accessed August 2, 2019. <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.89>.

“Bladder Cancer Treatment (PDQ®) - PDQ Cancer Information Summaries - NCBI Bookshelf.” 2017. January 20, 2017. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65962/#CDR0000062908__81.

Blanca Pedregosa, A. M., Á Sánchez-González, J. Carrasco Valiente, J. M. Ruiz García, E. Gómez Gómez, A. López Beltrán, and M. J. Requena Tapia. 2017. “Expression of Proteins FGFR3, PI3K, AKT, P21Waf1/Cip1 and Cyclins D1 and D3 in Patients with T1 Bladder Tumours: Clinical Implications and Prognostic Significance.” *Actas Urologicas Espanolas* 41 (3): 172–80. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2016.09.003>.

Bleeker, F. E., L. Felicioni, F. Buttitta, S. Lamba, L. Cardone, M. Rodolfo, A. Scarpa, et al. 2008. “AKT1(E17K) in Human Solid Tumours.” *Oncogene* 27 (42): 5648–50. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.170>.

Braun, B, and Sharing Expertise. 2017. “Fachwissen Palliative Care - Behandlung - Komplementäre Therapiekonzepte - Physiotherapie - Physiotherapeutische

Therapieformen in Der Palliativmedizin - Bindegewebsmassage Und Fußreflexzonenmassage." April 3, 2017. <http://www.palliativecare.bb Braun.de/cps/rde/xchg/om-palliativecare-de-de/hs.xsl/7683.html>.

Brausi, Maurizio, Jorg Oddens, Richard Sylvester, Aldo Bono, Cees van de Beek, George van Andel, Paolo Gontero, et al. 2014. "Side Effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in the Treatment of Intermediate- and High-Risk Ta, T1 Papillary Carcinoma of the Bladder: Results of the EORTC Genito-Urinary Cancers Group Randomised Phase 3 Study Comparing One-Third Dose with Full Dose and 1 Year with 3 Years of Maintenance BCG." *European Urology* 65 (1): 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.07.021>.

Breyer, Johannes, Ralph M. Wirtz, Mark Laible, Kornelia Schlombs, Philipp Erben, Maximilian Christian Kriegmair, Robert Stoehr, et al. 2016. "ESR1, ERBB2, and Ki67 mRNA Expression Predicts Stage and Grade of Non-Muscle-Invasive Bladder Carcinoma (NMIBC)." *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 469 (5): 547–52. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-2002-1>.

Brown, Kristin, and Alex Prof. Toker. 2007. "PI3K / Akt Signaling Pathway | Cell Signaling Technology." September 2007. <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-akt-signaling&pathway=PI3K%20/%20Akt%20Signaling>.

Budman, Lorne I, Wassim Kassouf, and Jordan R Steinberg. 2008. "Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer." *Canadian Urological Association Journal* 2 (3): 212–21.

Burger, Maximilian, James W. F. Catto, Guido Dalbagni, H. Barton Grossman, Harry Herr, Pierre Karakiewicz, Wassim Kassouf, et al. 2013. "Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer." *European Urology* 63 (2): 234–41. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>.

Burger, Maximilian, H. Barton Grossman, Michael Droller, Joerg Schmidbauer, Gregers Hermann, Octavian Drăgoescu, Eleanor Ray, et al. 2013. "Photodynamic Diagnosis of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer with Hexaminolevulinate Cystoscopy: A Meta-Analysis of Detection and Recurrence Based on Raw Data." *European Urology* 64 (5): 846–54. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.03.059>.

-
- Cai, Bo, Limin Ma, Shaojun Nong, You Wu, Xin Guo, and Jinxian Pu. 2018a. “ β -Elemene Induced Anticancer Effect in Bladder Cancer through Upregulation of PTEN and Suppression of AKT Phosphorylation.” *Oncology Letters* 16 (5): 6019–25. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9401>.
- 2018b. “B-elemene Induced Anticancer Effect in Bladder Cancer through Upregulation of PTEN and Suppression of AKT Phosphorylation.” *Oncology Letters* 16 (5): 6019–25. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9401>.
- Cantiello, Francesco, Antonio Cicione, Andrea Salonia, Riccardo Autorino, Cosimo De Nunzio, Alberto Briganti, Giorgio Gandaglia, Paolo Dell’Oglio, Paolo Capogrosso, and Rocco Damiano. 2015. “Association between Metabolic Syndrome, Obesity, Diabetes Mellitus and Oncological Outcomes of Bladder Cancer: A Systematic Review.” *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association* 22 (1): 22–32. <https://doi.org/10.1111/iju.12644>.
- Carpten, John D., Andrew L. Faber, Candice Horn, Gregory P. Donoho, Stephen L. Briggs, Christiane M. Robbins, Galen Hostetter, et al. 2007. “A Transforming Mutation in the Pleckstrin Homology Domain of AKT1 in Cancer.” *Nature* 448 (7152): 439–44. <https://doi.org/10.1038/nature05933>.
- Caspritz, Sandra, Monika Dr. Christ, Anke Dr. Ernst, Juliane Dr. Folkerts, Jutta Dr. Hansmann, Stefanie Dr. Klein, Kristine Dr. Krankhöfer, et al. 2015. *Krebs in Deutschland 2011/2012 - Beiträge Zur Gesundheitsberichterstattung Des Bundes*. Berlin: Robert Koch - Institut.
- Chen, Yao-Li, Po-Ming Chen, Ying-Zi Ming, Ping-Yi Lin, Chih-Ping Chu, and Pei-Yi Chu. 2017. “Phosphorylated AKT Expression in Tumor-Adjacent Normal Tissue Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma.” *Oncology Letters* 14 (6): 7461. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7137>.
- Cheng, J. Q., B. Ruggeri, W. M. Klein, G. Sonoda, D. A. Altomare, D. K. Watson, and J. R. Testa. 1996. “Amplification of AKT2 in Human Pancreatic Cells and Inhibition of AKT2 Expression and Tumorigenicity by Antisense RNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (8): 3636–41.

-
- Clark, Peter E., Neeraj Agarwal, Matthew C. Biagioli, Mario A. Eisenberger, Richard E. Greenberg, Harry W. Herr, Brant A. Inman, et al. 2013. "Bladder Cancer." *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 11 (4): 446–75.
- Cordon-Cardo, Carlos. 2008. "Molecular Alterations Associated with Bladder Cancer Initiation and Progression." *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. Supplementum*, no. 218 (September): 154–65. <https://doi.org/10.1080/03008880802291915>.
- Costa, Céu, Sofia Pereira, Luís Lima, Andreia Peixoto, Elisabete Fernandes, Diogo Neves, Manuel Neves, et al. 2015a. "Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/MTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics." *PLoS ONE* 10 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141253>.
- 2015b. "Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/MTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics." *PLoS ONE* 10 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141253>.
- Crocetti, Emanuele. 2017. "Epidemiology of Bladder Cancer in Europe - EU Science Hub - European Commission." EU Science Hub. March 8, 2017. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/epidemiology-bladder-cancer-europe>.
- Dahlman-Wright, Karin, Vincent Cavailles, Suzanne A. Fuqua, V. Craig Jordan, John A. Katzenellenbogen, Kenneth S. Korach, Adriana Maggi, Masami Muramatsu, Malcolm G. Parker, and Jan-Åke Gustafsson. 2006. "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors." *Pharmacological Reviews* 58 (4): 773–81. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.8>.
- Deutsche Diabetes Hilfe. 2010. "Diabetes in Zahlen." diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe. February 4, 2010. https://www.diabetesde.org/ueber_diabetes/was_ist_diabetes_/diabetes_in_zahlen.
- DGU, and IABC. 2016. "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie Und Nachsorge Des Harnblasenkarzinoms."
- D.M.A. Attia, and A.G.H. Ederveen. 2011. "Opposing Roles of ER α and ER β in the Genesis and Progression of Adenocarcinoma in the Rat Ventral Prostate - Attia - 2011 -

The Prostate - Wiley Online Library. " October 24, 2011. <http://online-library.wiley.com/doi/10.1002/pros.21507/abstract>.

Dorp, F. vom, A. Eisenhardt, P.J. Goebell, G. Jakse, T. Jäger, D. Jocham, A. Karl, et al. 2007. *Uroonkologie*. 6. Auflage. Springer.

Dr. Schwerenz, Inge, and Klaus Schwerenz. n.d. "Krankheitsbild - Initiative Forschung Und Therapie Für Die Spinale Muskelatrophie." Accessed May 2, 2017. <http://www.initiative-sma.de/was-ist-sma/krankheitsbild/>.

Dreicer, Robert. 2009. "Second-Line Chemotherapy for Advanced Urothelial Cancer: Because We Should or Because We Can?" *Journal of Clinical Oncology* 27 (27): 4444–45. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.8071>.

"Epidemiologie Des Diabetes in Deutschland." n.d. Accessed June 15, 2020. https://www.diabetesde.org/system/files/documents/gesundheitsbericht_2018.pdf.

Faes, Seraina, and Olivier Dormond. 2015. "PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (9): 21138–52. <https://doi.org/10.3390/ijms160921138>.

Fahmy, Omar, Khairul Asri, Christian Schwentner, Arnulf Stenzl, and Georgios Gakis. 2015. "Current Status of Robotic Assisted Radical Cystectomy with Intracorporeal Ileal Neobladder for Bladder Cancer." *Journal of Surgical Oncology* 112 (4): 427–29. <https://doi.org/10.1002/jso.24007>.

Fang, Hong, Baodong Yao, Yujie Yan, Huilin Xu, Yinan Liu, Hongmei Tang, Jie Zhou, et al. 2013. "Diabetes Mellitus Increases the Risk of Bladder Cancer: An Updated Meta-Analysis of Observational Studies." *Diabetes Technology & Therapeutics* 15 (11): 914–22. <https://doi.org/10.1089/dia.2013.0131>.

Frasca, F., G. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I. D. Goldfine, A. Belfiore, and R. Vigneri. 1999. "Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and Cancer Cells." *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3278–88.

-
- Friedrichs, R., H. Rübber, H. W. Stuhlsatz, and W. Lutzeyer. 1985. "Urothel Und Glykolyx Der Harnblase. Chemie — Aktuelle Klinische Aspekte." 1985. http://rd.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-82538-5_71.
- Fry, Christopher H., and Bahareh Vahabi. 2016. "The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 119 (October): 57–62. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12626>.
- Fukushima, Hiroshi, Hitoshi Masuda, Satoru Kawakami, Masaya Ito, Mizuaki Sakura, Noboru Numao, Fumitaka Koga, et al. 2012. "Effect of Diabetes Mellitus on High-Grade Prostate Cancer Detection among Japanese Obese Patients with Prostate-Specific Antigen Less than 10 Ng/ML." *Urology* 79 (6): 1329–34. <https://doi.org/10.1016/j.urolgy.2012.01.070>.
- "Gesundheitsbericht_2020.Pdf." n.d. Accessed June 28, 2020. https://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Stellungnahmen/Gesundheitspolitik/Gesundheitsbericht_2020.pdf.
- Giguère, Vincent, Na Yang, Prudimar Segui, and Ronald M. Evans. 1988. "Identification of a New Class of Steroid Hormone Receptors." *Nature* 331 (6151): 91–94. <https://doi.org/10.1038/331091a0>.
- Giovannucci, Edward, David M. Harlan, Michael C. Archer, Richard M. Bergenstal, Susan M. Gapstur, Laurel A. Habel, Michael Pollak, Judith G. Regensteiner, and Douglas Yee. 2010. "Diabetes and Cancer." *Diabetes Care* 33 (7): 1674–85. <https://doi.org/10.2337/dc10-0666>.
- Godoy, Guilherme, Georgios Gakis, Carolyn L. Smith, and Omar Fahmy. 2016a. "Effects of Androgen and Estrogen Receptor Signaling Pathways on Bladder Cancer Initiation and Progression." *Bladder Cancer* 2 (2): 127–37. <https://doi.org/10.3233/BLC-160052>.
- 2016b. "Effects of Androgen and Estrogen Receptor Signaling Pathways on Bladder Cancer Initiation and Progression." *Bladder Cancer* 2 (2): 127–37. <https://doi.org/10.3233/BLC-160052>.
- Gonzalez-Roibon, Nilda, Jenny J. Kim, Sheila F. Faraj, Alcides Chaux, Stephania M. Bezerra, Enrico Munari, Carla Ellis, et al. 2014. "Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Overexpression Is Associated with Outcome in Invasive Urothelial Carcinoma of

Urinary Bladder: A Retrospective Study of Patients Treated Using Radical Cystectomy." *Urology* 83 (6): 1444.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.01.028>.

Gorden, P., R. Arakaki, E. Collier, and J. L. Carpentier. 1989. "Biosynthesis and Regulation of the Insulin Receptor." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 62 (5): 521–31.

Govindarajan, Rangaswamy, Luke Ratnasinghe, Debra L. Simmons, Eric R. Siegel, Madhu V. Midathada, Lawrence Kim, Peter J. Kim, Randall J. Owens, and Nicholas P. Lang. 2007. "Thiazolidinediones and the Risk of Lung, Prostate, and Colon Cancer in Patients with Diabetes." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (12): 1476–81. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.2777>.

Haeusler, Rebecca A., Timothy E. McGraw, and Domenico Accili. 2018. "Biochemical and Cellular Properties of Insulin Receptor Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (1): 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>.

Haisa, Minoru. 2013. "The Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Signalling System and Targeted Tyrosine Kinase Inhibition in Cancer." *The Journal of International Medical Research* 41 (2): 253–64. <https://doi.org/10.1177/0300060513476585>.

Harb-de la Rosa, Alfredo, Matthew Acker, Raj A. Kumar, and Murugesan Manoharan. 2015. "Epigenetics Application in the Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer." *The Canadian Journal of Urology* 22 (5): 7947–51.

Harris, H. A. 2006. "Preclinical Characterization of Selective Estrogen Receptor Beta Agonists: New Insights into Their Therapeutic Potential." *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, no. 1: 149–61.

Harris, Loleta D., Jorge De La Cerda, Tomas Tuziak, Daniel Rosen, Lianchun Xiao, Yu Shen, Anita L. Sabichi, Bogdan Czerniak, and H. Barton Grossman. 2008. "Analysis of the Expression of Biomarkers in Urinary Bladder Cancer Using a Tissue Microarray." *Molecular Carcinogenesis* 47 (9): 678–85. <https://doi.org/10.1002/mc.20420>.

Heberling, Ulrike, Rainer Koch, Matthias Hübler, Gustavo B. Baretton, Oliver W. Hakenberg, Manfred P. Wirth, and Michael Froehner. 2018. "Gender and Mortality after Radical Cystectomy: Competing Risk Analysis." *Urologia Internationalis* 101 (3): 293–99. <https://doi.org/10.1159/000487445>.

-
- Heidegger, Isabel, Johann Kern, Philipp Ofer, Helmut Klocker, and Petra Massoner. 2014. "Oncogenic Functions of IGF1R and INSR in Prostate Cancer Include Enhanced Tumor Growth, Cell Migration and Angiogenesis." *Oncotarget* 5 (9): 2723–35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1884>.
- Heidemann, C., Y. Du, R. Paprott, M. Haftenberger, W. Rathmann, and C. Scheidt-Nave. 2016. "Temporal Changes in the Prevalence of Diagnosed Diabetes, Undiagnosed Diabetes and Prediabetes: Findings from the German Health Interview and Examination Surveys in 1997-1999 and 2008-2011." *Diabetic Medicine* 33 (10): 1406–14. <https://doi.org/10.1111/dme.13008>.
- Heidemann, C., H. Niemann, R. Paprott, Y. Du, W. Rathmann, and C. Scheidt-Nave. 2014a. "Residential Traffic and Incidence of Type 2 Diabetes: The German Health Interview and Examination Surveys." *Diabetic Medicine* 31 (10): 1269–76. <https://doi.org/10.1111/dme.12480>.
- 2014b. "Residential Traffic and Incidence of Type 2 Diabetes: The German Health Interview and Examination Surveys." *Diabetic Medicine* 31 (10): 1269–76. <https://doi.org/10.1111/dme.12480>.
- Heni, Martin, Jörg Hennenlotter, Marcus Scharpf, Stefan Z. Lutz, Christian Schwentner, Tilman Todenhöfer, David Schilling, et al. 2012. "Insulin Receptor Isoforms A and B as Well as Insulin Receptor Substrates-1 and -2 Are Differentially Expressed in Prostate Cancer." *PloS One* 7 (12): e50953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050953>.
- Héron-Milhavet, Lisa, Celine Franckhauser, Vanessa Rana, Cyril Berthenet, Daniel Fisher, Brian A. Hemmings, Anne Fernandez, and Ned J. C. Lamb. 2006. "Only Akt1 Is Required for Proliferation, While Akt2 Promotes Cell Cycle Exit through P21 Binding." *Molecular and Cellular Biology* 26 (22): 8267–80. <https://doi.org/10.1128/MCB.00201-06>.
- Hers, Ingeborg, Emma E. Vincent, and Jeremy M. Tavaré. 2011. "Akt Signalling in Health and Disease." *Cellular Signalling* 23 (10): 1515–27. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>.
- Hirsch, Heather A., Dimitrios Iliopoulos, Philip N. Tsichlis, and Kevin Struhl. 2009. "Metformin Selectively Targets Cancer Stem Cells, and Acts Together with Chemotherapy to

Block Tumor Growth and Prolong Remission.” *Cancer Research* 69 (19): 7507–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2994>.

Holtz, Renate. n.d. *Therapie Und Alltagshilfen Für Zerebralparetische Kinder*. 1997: Pflaum.

Hooper, Claudie. 2017. “An Overview of Insulin Signaling Pathways | Abcam.” 2017. <http://www.abcam.com/pathways/overview-of-insulin-signaling-pathways>.

Horsanali, Ozer, Gorgel, and Ozbek. 2016. “Diabetes Mellitus Is Associated with High Grade and High Stage in Urinary Bladder Cancer.” 2016. <https://smjournals.com/urology/fulltext/smju-v2-1020.php>.

Houédé, Nadine, and Philippe Pourquier. 2015a. “Targeting the Genetic Alterations of the PI3K–AKT–MTOR Pathway: Its Potential Use in the Treatment of Bladder Cancers.” *Pharmacology & Therapeutics* 145 (January): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.06.004>.

2015b. “Targeting the Genetic Alterations of the PI3K-AKT-MTOR Pathway: Its Potential Use in the Treatment of Bladder Cancers.” *Pharmacology & Therapeutics* 145 (January): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.06.004>.

Hsu, lawen, Spencer Vitkus, Jun Da, and Shuyuan Yeh. 2013. “Role of Oestrogen Receptors in Bladder Cancer Development.” *Nature Reviews Urology* 10 (6): 317–26. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.53>.

Humphrey, Peter A., Holger Moch, Antonio L. Cubilla, Thomas M. Ulbright, and Victor E. Reuter. 2016. “The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours.” *European Urology* 70 (1): 106–19. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>.

Hwang, Eu Chang, Young Jung Kim, In Sang Hwang, Jun Eul Hwang, Seung Il Jung, Dong Deuk Kwon, Kwangsung Park, and Soo Bang Ryu. 2011. “Impact of Diabetes Mellitus on Recurrence and Progression in Patients with Non-Muscle Invasive Bladder Carcinoma: A Retrospective Cohort Study.” *International Journal of Urology* 18 (11): 769–76. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2011.02845.x>.

Ide, Hiroki, Satoshi Inoue, and Hiroshi Miyamoto. 2017. “Histopathological and Prognostic Significance of the Expression of Sex Hormone Receptors in Bladder Cancer: A Meta-

-
- Analysis of Immunohistochemical Studies.” *PloS One* 12 (3): e0174746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174746>.
- Ide, Hiroki, and Hiroshi Miyamoto. 2015. “Steroid Hormone Receptor Signals as Prognosticators for Urothelial Tumor.” *Disease Markers* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/840640>.
- Jiang, Liyan, Wei Zhu, Katie Streicher, Chris Morehouse, Philip Brohawn, Xiaoxiao Ge, Zhengwei Dong, et al. 2014. “Increased IR-A/IR-B Ratio in Non-Small Cell Lung Cancers Associates with Lower Epithelial-Mesenchymal Transition Signature and Longer Survival in Squamous Cell Lung Carcinoma.” *BMC Cancer* 14 (February): 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-131>.
- Jl, Mostwin. 1991. “Current Concepts of Female Pelvic Anatomy and Physiology.” *The Urologic Clinics of North America* 18 (2): 175–95.
- Jones, P. F., T. Jakubowicz, and B. A. Hemmings. 1991. “Molecular Cloning of a Second Form of Rac Protein Kinase.” *Cell Regulation* 2 (12): 1001–9. <https://doi.org/10.1091/mbc.2.12.1001>.
- Joslin, E. P., H. L. Lombard, R. E. Burrows, and M. D. Manning. 1959. “Diabetes and Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 260 (10): 486–88. <https://doi.org/10.1056/NEJM195903052601007>.
- Kacalska, Olga, Magdalena Krzyczkowska-Sendrakowska, Tomasz Milewicz, Marta Zabińska-Popiela, Tomasz Bereza, Gracjana Krzysiek-Maczka, and Józef Krzysiek. 2005. “[Molecular action of insulin-sensitizing agents].” *Endokrynologia Polska* 56 (3): 308–13.
- Takehi, Yoshiyuki, Yoshihiko Hirao, Wun-Jae Kim, Seiichiro Ozono, Naoya Masumori, Naoto Miyana, Yasutomo Nasu, and Akira Yokomizo. 2010. “Bladder Cancer Working Group Report.” *Japanese Journal of Clinical Oncology* 40 Suppl 1 (September): i57-64. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyq128>.
- Kang, Josephine, Ming-Hui Chen, Yuanye Zhang, Brian J. Moran, Daniel E. Dosoretz, Michael J. Katin, Michelle H. Braccioforte, Sharon A. Salenius, and Anthony V. D’Amico. 2012. “Type of Diabetes Mellitus and the Odds of Gleason Score 8 to 10 Prostate

Cancer.” *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 82 (3): e463-467. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.07.003>.

Kaplan, E. L., and Paul Meier. 1958. “Nonparametric Estimation from Incomplete Observations.” *Journal of the American Statistical Association* 53 (282): 457–81. <https://doi.org/10.2307/2281868>.

“Kernrezeptor - DocCheck Flexikon.” n.d. Accessed January 30, 2017. <http://flexikon.doccheck.com/de/Kernrezeptor>.

King, K., and M. Steggall. 2014. “Haematuria: From Identification to Treatment.” 2014. <http://discovery.ucl.ac.uk/1474172/>.

Kirchner, T., LMU München, and Philipp Hägel. n.d. “Immunhistochemie - Pathologisches Institut - LMU München.” Accessed January 31, 2017. <http://www.pathologie.med.uni-muenchen.de/010diagnostik/030immunhisto/index.html>.

Kojima, Takahiro, Koji Kawai, Jun Miyazaki, and Hiroyuki Nishiyama. 2017. “Biomarkers for Precision Medicine in Bladder Cancer.” *International Journal of Clinical Oncology* 22 (2): 207–13. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-1068-8>.

Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Bärlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter, and O. P. Kallioniemi. 1998. “Tissue Microarrays for High-Throughput Molecular Profiling of Tumor Specimens.” *Nature Medicine* 4 (7): 844–47.

Kopparapu, Pradeep Kumar, Stephen A. Boorjian, Brian D. Robinson, Martin Downes, Lorraine J. Gudas, Nigel P. Mongan, and Jenny L. Persson. 2013. “Expression of VEGF and Its Receptors VEGFR1/VEGFR2 Is Associated with Invasiveness of Bladder Cancer.” *Anticancer Research* 33 (6): 2381–90.

Koro, Carol, Steven Barrett, and Nawab Qizilbash. 2007. “Cancer Risks in Thiazolidinedione Users Compared to Other Anti-Diabetic Agents.” *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 16 (5): 485–92. <https://doi.org/10.1002/pds.1352>.

Kramer, David Kitz. 2013. “Immunhistochemie (IHC) (Ressourcen).” December 6, 2013. <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1216/immunhistochemie-ihc/>.

-
- Kubota, M., and Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. 2000. “[Proteinkinase B/Akt].” *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi = Japanese journal of psychopharmacology* 20 (5): 199–202.
- Kuefer, R., M. D. Hofer, J. E. Gschwend, and M. A. Rubin. 2004. “Tissue-Microarrays.” *Der Urologe, Ausgabe A* 43 (6): 659–68. <https://doi.org/10.1007/s00120-004-0576-8>.
- Kumar, Chandra C., and Vincent Madison. 2005. “AKT Crystal Structure and AKT-Specific Inhibitors.” *Oncogene* 24 (50): 7493–7501. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209087>.
- Kwiatkowska, Marta, Bartosz Dybowski, Olga Kuczkiewicz-Siemion, Rafał Osiecki, Kaja Śmigielńska, Stefan Gonczar, Sławomir Poletajew, and Piotr Radziszewski. 2017. “Factors Affecting One-Year Survival after Radical Cystectomy: A Prospective Study.” *Central European Journal of Urology* 70 (3): 238–44. <https://doi.org/10.5173/cej.2017.1484>.
- Landeweer, Gert Groot. 2007. *Einführung in Die CranioSacrale Therapie - Wie Man Körperliche Blockaden Selbst Lösen Kann*. Kreuzlingen / München: Heinrich Hugendubel Verlag.
- Large, Michael Christopher. 2016. “Radical Cystectomy: Background, History of the Procedure, Problem.” November 2016. <http://emedicine.medscape.com/article/448623-overview#a12>.
- Larsen, Louise Katrine, Guro Elisabeth Lind, Per Guldborg, and Christina Dahl. 2019. “DNA-Methylation-Based Detection of Urological Cancer in Urine: Overview of Biomarkers and Considerations on Biomarker Design, Source of DNA, and Detection Technologies.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11): 2657. <https://doi.org/10.3390/ijms20112657>.
- Larsson, S. C., N. Orsini, K. Brismar, and A. Wolk. 2006. “Diabetes Mellitus and Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis.” *Diabetologia* 49 (12): 2819–23. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0468-0>.
- Lawlor, Margaret A., and Dario R. Alessi. 2001. “PKB/Akt: A Key Mediator of Cell Proliferation, Survival and Insulin Responses?” *Journal of Cell Science* 114 (16): 2903–10.

-
- Li, Roger, Woonyoung Choi, J.E. Ferguson rd, Michael J. Metcalfe, and Ashish M. Kamat. 2016. "New Discoveries in the Molecular Landscape of Bladder Cancer." *F1000Research* 5 (December): 2875. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10031.1>.
- Li, Roger, Michael J. Metcalfe, James E. Ferguson, Sharada Mokkapati, Graciela M. Noguera González, Colin P. Dinney, Neema Navai, David J. McConkey, Sunil K. Sahai, and Ashish M. Kamat. 2018. "Effects of Thiazolidinedione in Patients with Active Bladder Cancer." *BJU International* 121 (2): 244–51. <https://doi.org/10.1111/bju.14009>.
- Lipscombe, Lorraine L., Hadas D. Fischer, Peter C. Austin, Longdi Fu, R. Liisa Jaakkimainen, Ophira Ginsburg, Paula A. Rochon, Steven Narod, and Lawrence Paszat. 2015. "The Association between Diabetes and Breast Cancer Stage at Diagnosis: A Population-Based Study." *Breast Cancer Research and Treatment* 150 (3): 613–20. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3323-5>.
- Liss, Michael A., Martha White, Loki Natarajan, and J. Kellogg Parsons. 2016. "Exercise Decreases and Smoking Increases Bladder Cancer Mortality." *Clinical Genitourinary Cancer*, December. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.11.006>.
- Lizcano, Jose M., and Dario R. Alessi. 2002. "The Insulin Signalling Pathway." *Current Biology* 12 (7): R236–38. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00777-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00777-7).
- Lotan, Yair, Robert S. Svatek, and Núria Malats. 2008. "Screening for Bladder Cancer: A Perspective." *World Journal of Urology* 26 (1): 13–18. <https://doi.org/10.1007/s00345-007-0223-2>.
- Lu, Junmi, Hongjing Zang, Hongmei Zheng, Yuting Zhan, Yang Yang, Yuting Zhang, Sile Liu, et al. 2020. "Overexpression of P-Akt, p-MTOR and p-EIF4E Proteins Associates with Metastasis and Unfavorable Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer." *PLOS ONE* 15 (2): e0227768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227768>.
- Luo, Jiadi, Juan Feng, Qiuyuan Wen, Christopher Qoyawayma, Weiyuan Wang, Lingjiao Chen, Junmi Lu, et al. 2018. "Elevated Expression of IRS-1 Associates with p-Akt Expression and Predicts Poor Prognosis of Breast Invasive Ductal Carcinoma." *Human Pathology*, March. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.03.003>.

-
- Luo, Z., R. Wu, Y. Jiang, Z. Qiu, W. Chen, and W. Li. 2015. "Overexpression of Estrogen Receptor Beta Is a Prognostic Marker in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (6): 8686–97.
- Maas, Moritz, Jens Bedke, Arnulf Stenzl, and Tilman Todenhöfer. 2018. "Can Urinary Biomarkers Replace Cystoscopy?" *World Journal of Urology*, October. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2505-2>.
- MacKenzie, Todd, Michael S. Zens, Assiamira Ferrara, Alan Schned, and Margaret R. Karagas. 2011. "Diabetes and Risk of Bladder Cancer: Evidence from a Case-Control Study in New England." *Cancer* 117 (7): 1552–56. <https://doi.org/10.1002/cncr.25641>.
- Maira, G SI, G Arrigoni, O Marin, S Sarno, F Brustolon, L. A. Pinna, and M. Ruzzene. 2005. "Protein Kinase CK2 Phosphorylates and Upregulates Akt/PKB | Cell Death & Differentiation." 04 2005. <https://www.nature.com/articles/4401604>.
- Malmström, Per-Uno, Richard J. Sylvester, David E. Crawford, Martin Friedrich, Susanne Krege, Erkki Rintala, Eduardo Solsona, Savino M. Di Stasi, and J. Alfred Witjes. 2009. "An Individual Patient Data Meta-Analysis of the Long-Term Outcome of Randomised Studies Comparing Intravesical Mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guérin for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer." *European Urology* 56 (2): 247–56. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.04.038>.
- Mandhani, Anil, Anand Dharaskar, and Rakesh Kapoor. 2010. "Technical Steps of Open Radical Cystectomy and Orthotopic Neobladder to Achieve the Goals of 'Minimally Invasive Surgery'?" *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India* 26 (3): 457–60. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.70596>.
- Manning, Brendan D., and Lewis C. Cantley. 2007. "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream." *Cell* 129 (7): 1261–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>.
- Manski. 2017a. "Harnblasenkarzinom Pathologie – Www.Urologielehrbuch.De." January 2017. http://www.urologielehrbuch.de/harnblasenkarzinom_02.html.
- Manski, Dirk. 2017b. "Harnblase: Anatomie (Histologie Des Urothels)." 2017. http://www.urologielehrbuch.de/harnblasenanatomie_03.html.
- Mashhadi, Rahil, Gholamreza Pourmand, Farid Kosari, Abdolrasoul Mehrsai, Sepehr Saleh, Mohammad Reza Pourmand, Sudabeh Alatab, et al. 2014. "Role of Steroid

Hormone Receptors in Formation and Progression of Bladder Carcinoma: A Case-Control Study.” *Urology Journal* 11 (6): 1968–73.

Massard, Christophe, Michael S. Gordon, Sunil Sharma, Saeed Rafii, Zev A. Wainberg, Jason Luke, Tyler J. Curiel, et al. 2016. “Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (26): 3119–25. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.9761>.

McFarland, MS, and R. Cripps. 2010. “Diabetes Mellitus and Increased Risk of Cancer: Focus on Metformin and the Insulin Analogs. - PubMed - NCBI.” 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20973689>.

Metalli, David, Francesca Lovat, Farida Tripodi, Marco Genua, Shi-Qiong Xu, Michela Spinelli, Lilia Alberghina, et al. 2010. “The Insulin-like Growth Factor Receptor I Promotes Motility and Invasion of Bladder Cancer Cells through Akt- and Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Activation of Paxillin.” *The American Journal of Pathology* 176 (6): 2997–3006. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090904>.

“Microhematuria: Asymptomatic - American Urological Association.” 2019. 2019. [https://www.auanet.org/guidelines/asymptomatic-microhematuria-\(amh\)-guideline](https://www.auanet.org/guidelines/asymptomatic-microhematuria-(amh)-guideline).

Mirzoeva, OK, et, B Hann, YK Hom, J Debnath, D Aftab, K Shokat, and WM Korn. 2011. “Autophagy Suppression Promotes Apoptotic Cell Death in Response to Inhibition of the PI3K-MTOR Pathway in Pancreatic Adenocarcinoma. - PubMed - NCBI.” September 2011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21678117>.

Mitra, Anirban P., Donna E. Hansel, and Richard J. Cote. 2012. “Prognostic Value of Cell-Cycle Regulation Biomarkers in Bladder Cancer.” *Seminars in Oncology* 39 (5): 524–33. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.08.008>.

Miyamoto, Hiroshi, Jorge L. Yao, Alcides Chaux, Yichun Zheng, lawen Hsu, Koji Izumi, Chawnshang Chang, Edward M. Messing, George J. Netto, and Shuyuan Yeh. 2012a. “Expression of Androgen and Oestrogen Receptors and Its Prognostic Significance in Urothelial Neoplasm of the Urinary Bladder.” *BJU International* 109 (11): 1716–26. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10706.x>.

2012b. "Expression of Androgen and Oestrogen Receptors and Its Prognostic Significance in Urothelial Neoplasm of the Urinary Bladder." *BJU International* 109 (11): 1716–26. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10706.x>.

Moller, D. E., A. Yokota, J. F. Caro, and J. S. Flier. 1989. "Tissue-Specific Expression of Two Alternatively Spliced Insulin Receptor MRNAs in Man." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 3 (8): 1263–69. <https://doi.org/10.1210/mend-3-8-1263>.

Moriceau, Guillaume, Alexis Vallard, Romain Rivoirard, Benoîte Méry, Sophie Espenel, Julien Langrand-Escure, Majed Ben Mrad, et al. 2015. "Real-World Vinflunine Outcomes in Bladder Cancer in a Single-Institution Study: Moving Beyond Clinical Trials." *Clinical Genitourinary Cancer* 13 (6): 588–92. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.05.008>.

Morioka, Masaaki, Yoshimasa Jo, Yoji Furukawa, Keigo Kinugawa, Atsushi Sone, Takakazu Matsuki, Tatsuya Kobayashi, Tomohiro Fujii, and Hiroyoshi Tanaka. 2001. "Prognostic Factors for Survival and Bladder Recurrence in Transitional Cell Carcinoma of the Upper Urinary Tract." *International Journal of Urology* 8 (7): 366–73. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2042.2001.00315.x>.

Müssig, K., H. Staiger, K. Kantartzis, A. Fritsche, L. Kanz, and H.-U. Häring. 2011a. "Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Malignancy: Is There a Strategy to Identify a Subphenotype of Patients with Increased Susceptibility to Endogenous and Exogenous Hyperinsulinism?" *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 28 (3): 276–86. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03132.x>.

2011b. "Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Malignancy: Is There a Strategy to Identify a Subphenotype of Patients with Increased Susceptibility to Endogenous and Exogenous Hyperinsulinism?" *Diabetic Medicine* 28 (3): 276–86. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03132.x>.

Nakagawa, Tohru, Satoru Taguchi, Yukari Uemura, Atsushi Kanatani, Masaomi Ikeda, Akihiko Matsumoto, Kanae Yoshida, et al. 2017. "Nomogram for Predicting Survival of Postcystectomy Recurrent Urothelial Carcinoma of the Bladder." *Urologic Oncology* 35 (7): 457.e15–457.e21. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.12.010>.

"Nomogram for Predicting Survival of Postcystectomy Recurrent Urothelial Carcinoma of the Bladder." *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Accessed January 27, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.12.010>.

-
- Nandagopal, Lakshminarayanan, and Guru Sonpavde. 2016. "Circulating Biomarkers in Bladder Cancer." *Bladder Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2 (4): 369–79. <https://doi.org/10.3233/BLC-160075>.
- "NCI Dictionary of Cancer Terms." 2018. NciAppModulePage. National Cancer Institute. May 4, 2018. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>.
- Nelson, Adam W., Arnoud J. Groen, Jodi L. Miller, Anne Y. Warren, Kelly A. Holmes, Gerard A. Tarulli, Wayne D. Tilley, et al. 2017. "Comprehensive Assessment of Estrogen Receptor Beta Antibodies in Cancer Cell Line Models and Tissue Reveals Critical Limitations in Reagent Specificity." *Molecular and Cellular Endocrinology* 440 (January): 138–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.016>.
- Nevins, J. R. 2001. "The Rb/E2F Pathway and Cancer." *Human Molecular Genetics* 10 (7): 699–703.
- Newton, Christina, Susan Gapstur, Peter Campbell, and Eric Jacobs. 2013. "Newton CC, Gapstur SM, Campbell PT, Jacobs EJ Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin-Use and Risk of Bladder Cancer in a Large Cohort Study. *Int J Cancer* 132: 2186-2191." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 132 (May). <https://doi.org/10.1002/ijc.27878>.
- Nicholson, Karleen M., and Neil G. Anderson. 2002. "The Protein Kinase B/Akt Signalling Pathway in Human Malignancy." *Cellular Signalling* 14 (5): 381–95.
- Nilsson, M., S. Naessén, I. Dahlman, A. Lindén Hirschberg, J.-A. Gustafsson, and K. Dahlman-Wright. 2004. "Association of Estrogen Receptor Beta Gene Polymorphisms with Bulimic Disease in Women." *Molecular Psychiatry* 9 (1): 28–34. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001402>.
- Nilsson, Stefan, Sari Mäkelä, Eckardt Treuter, Michel Tujague, Jane Thomsen, Göran Andersson, Eva Enmark, Katarina Pettersson, Margaret Warner, and Jan-Åke Gustafsson. 2001. "Mechanisms of Estrogen Action." *Physiological Reviews* 81 (4): 1535–65.
- Ofer, Philipp, Isabel Heidegger, Iris E. Eder, Bernd Schöpf, Hannes Neuwirt, Stephan Geley, Helmut Klocker, and Petra Massoner. 2015. "Both IGF1R and INSR Knockdown

Exert Antitumorigenic Effects in Prostate Cancer In Vitro and In Vivo.” *Molecular Endocrinology* 29 (12): 1694–1707. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1073>.

Ogawa, S., M. Emi, M. Shiraki, T. Hosoi, Y. Ouchi, and S. Inoue. 2000. “Association of Estrogen Receptor Beta (ESR2) Gene Polymorphism with Blood Pressure.” *Journal of Human Genetics* 45 (6): 327–30. <https://doi.org/10.1007/s100380070002>.

Ogawa, S., T. Hosoi, M. Shiraki, H. Orimo, M. Emi, M. Muramatsu, Y. Ouchi, and S. Inoue. 2000. “Association of Estrogen Receptor Beta Gene Polymorphism with Bone Mineral Density.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269 (2): 537–41. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2285>.

Oh, Jong Jin, Min Yong Kang, Jung Ki Jo, Hak Min Lee, Seok-Soo Byun, Sang Eun Lee, Sangchul Lee, and Sung Kyu Hong. 2015. “Association between Diabetes Mellitus and Oncological Outcomes in Bladder Cancer Patients Undergoing Radical Cystectomy.” *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association* 22 (12): 1112–17. <https://doi.org/10.1111/iju.12901>.

Oing, Christoph, Michael Rink, Karin Oechsle, Christoph Seidel, Gunhild von Amsberg, and Carsten Bokemeyer. 2016. “Second Line Chemotherapy for Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma: Vinflunine and Beyond—A Comprehensive Review of the Current Literature.” *The Journal of Urology* 195 (2): 254–63. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.06.115>.

Okada, T., Y. Kawano, T. Sakakibara, O. Hazeki, and M. Ui. 1994. “Essential Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Insulin-Induced Glucose Transport and Antilipolysis in Rat Adipocytes. Studies with a Selective Inhibitor Wortmannin.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (5): 3568–73.

Oliveras-Ferraros, Cristina, Alejandro Vazquez-Martin, and Javier A. Menendez. 2009. “Genome-Wide Inhibitory Impact of the AMPK Activator Metformin on [Kinesins, Tubulins, Histones, Auroras and Polo-like Kinases] M-Phase Cell Cycle Genes in Human Breast Cancer Cells.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (10): 1633–36. <https://doi.org/10.4161/cc.8.10.8406>.

Omoto, Y., S. Inoue, S. Ogawa, T. Toyama, H. Yamashita, M. Muramatsu, S. Kobayashi, and H. Iwase. 2001. “Clinical Value of the Wild-Type Estrogen Receptor Beta Expression in Breast Cancer.” *Cancer Letters* 163 (2): 207–12.

-
- Pandey, A., V. Forte, M. Abdallah, A. Alickaj, S. Mahmud, S. Asad, and S. I. McFarlane. 2011. "Diabetes Mellitus and the Risk of Cancer." *Minerva Endocrinologica* 36 (3): 187–209.
- Patel, Manish R., John Allan Ellerton, Jeffrey R. Infante, Manish Agrawal, Michael S. Gordon, Raid Aljumaliy, Carolyn D. Britten, et al. 2017. "Avelumab in Patients with Metastatic Urothelial Carcinoma: Pooled Results from Two Cohorts of the Phase 1b JAVELIN Solid Tumor Trial." *Journal of Clinical Oncology* 35 (6_suppl): 330–330. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.6_suppl.330.
- Patel, Rutveej, Megan Bock, Charles F. Polotti, and Sammy Elsamra. 2017. "Pharmacokinetic Drug Evaluation of Atezolizumab for the Treatment of Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 13 (2): 225–32. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1277204>.
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. 2002. "Transitional Cell Cancer of the Renal Pelvis and Ureter Treatment (PDQ®): Health Professional Version." In *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66010/>.
- Peng, Mei, Yanjun Huang, Ting Tao, Cai-Yun Peng, Qiongli Su, Wanjun Xu, Kwame Oteng Darko, Xiaojun Tao, and Xiaoping Yang. 2016. "Metformin and Gefitinib Cooperate to Inhibit Bladder Cancer Growth via Both AMPK and EGFR Pathways Joining at Akt and Erk." 06 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4917871/>.
- Peterson, Arthur. 1977. "Expressing the Kaplan-Meier Estimator as a Function of Empirical Subsurvival Functions on JSTOR." *Journal of the American Statistical Association*, December. https://www.jstor.org/stable/2286474?seq=1#page_scan_tab_contents.
- Pierce, Brandon L. 2012. "Why Are Diabetics at Reduced Risk for Prostate Cancer? A Review of the Epidemiologic Evidence." *Urologic Oncology* 30 (5): 735–43. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.07.008>.
- Porta, Camillo, Chiara Paglino, and Alessandra Mosca. 2014. "Targeting PI3K/Akt/MTOR Signaling in Cancer." *Frontiers in Oncology* 4 (April). <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>.

Powles, Thomas, Joseph Paul Eder, Gregg D. Fine, Fadi S. Braiteh, Yohann Loriot, Cristina Cruz, Joaquim Bellmunt, et al. 2014a. "MPDL3280A (Anti-PD-L1) Treatment Leads to Clinical Activity in Metastatic Bladder Cancer." *Nature* 515 (7528): 558–62. <https://doi.org/10.1038/nature13904>.

———. 2014b. "MPDL3280A (Anti-PD-L1) Treatment Leads to Clinical Activity in Metastatic Bladder Cancer." *Nature* 515 (7528): 558–62. <https://doi.org/10.1038/nature13904>.

Powles, Thomas, Peter H. O'Donnell, Christophe Massard, Hendrik-Tobias Arkenau, Terence W. Friedlander, Christopher J. Hoimes, Jae Lyun Lee, et al. 2017. "Efficacy and Safety of Durvalumab in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma: Updated Results From a Phase 1/2 Open-Label Study." *JAMA Oncology* 3 (9): e172411. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2411>.

Prof. Dr. Korinthenberg, Rudolf, and Janbernd Dr. Kirschner. 2017. "Erklärung Der Krankheit SMA." April 15, 2017. <http://www.muskeltiftung.de/index.php/spinale-muskelatrophie/erklaerung-der-krankheit-sma>.

Prof. Dr. med. Kellerer. 2019. "Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2020."

Prof. Ezzati, Majid. 2015. "Effects of Diabetes Definition on Global Surveillance of Diabetes Prevalence and Diagnosis: A Pooled Analysis of 96 Population-Based Studies with 331 288 Participants." *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 3 (8): 624–37. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00129-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00129-1).

Prossnitz, Eric R., and Jeffrey B. Arterburn. 2015. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein–Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators." *Pharmacological Reviews* 67 (3): 505–40. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009712>.

Raitanen, Mika-P., Risto Aine, Erkki Rintala, Jukka Kallio, Pertti Rajala, Harri Juusela, and Teuvo L. J. Tammela. 2002. "Differences Between Local and Review Urinary Cytology in Diagnosis of Bladder Cancer. An Interobserver Multicenter Analysis." *European Urology* 41 (3): 284–89. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(02\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(02)00006-4).

Ramos-Nino, Maria E., Charles D. MacLean, and Benjamin Littenberg. 2007. "Association between Cancer Prevalence and Use of Thiazolidinediones: Results from the Vermont

Diabetes Information System.” *BMC Medicine* 5 (June): 17.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-5-17>.

Rassow, Joachim, Karin Hauser, Roland Netzker, and Rainer Deutzmann. 2016. *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage.

Remmele, W., and H. E. Stegner. 1987. “[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue].” *Der Pathologe* 8 (3): 138–40.

Rhijn, Bas W. G. van, Mireia Musquera, Liyang Liu, André N. Vis, Tahlita C. M. Zuiverloon, Geert J. L. H. van Leenders, Wim J. Kirkels, et al. 2015. “Molecular and Clinical Support for a Four-Tiered Grading System for Bladder Cancer Based on the WHO 1973 and 2004 Classifications.” *Modern Pathology* 28 (5): 695–705.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.154>.

Richard, Patrick O., Ardalan E. Ahmad, Shaheena Bashir, Alexandre Zlotta, Bimal Bhindi, Ricardo Leao, Madhur Nayan, Aza Mohammed, Neil E. Fleshner, and Girish S. Kulkarni. 2018. “Impact of Oral Hypoglycemic Agents on Mortality among Diabetic Patients with Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Populationbased Analysis.” *Canadian Urological Association Journal = Journal De l’Association Des Urologues Du Canada* 12 (6): 203–10. <https://doi.org/10.5489/cuaj.4870>.

Riella, Leonardo V., Alison M. Paterson, Arlene H. Sharpe, and Anil Chandraker. 2012. “Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response.” *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12 (10): 2575–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x>.

Rizzo, Donald C. 2015. *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. 4. Auflage. United States of America: Cengage Learning. https://books.google.de/books?id=vfe-oBAAAQBAJ&pg=PT468&dq=anatomy+and+physiology+bladder&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwjDsN2Evd_RAhUID5oKHR-wpBY8Q6AEIPDAE#v=onepage&q=anatomy%20and%20physiology%20bladder&f=false.

-
- RKI, and Destatis. 2015. "Kernaussagen 2.5 Diabetes Mellitus." [Http://Www.Gbe-Bund.de/Gbe10/Ergebnisse.Prc_tab?Fid=25123&suchstring=&query_id=&sprache=D&fund_typ=TXT&methode=&vt=&verwandte=1&page_ret=0&seite=1&p_lfd_nr=2&p_news=&p_sprachkz=D&p_uid=gast&p_aid=18704516&hlp_nr=2&p_janein=J](http://www.Gbe-Bund.de/Gbe10/Ergebnisse.Prc_tab?Fid=25123&suchstring=&query_id=&sprache=D&fund_typ=TXT&methode=&vt=&verwandte=1&page_ret=0&seite=1&p_lfd_nr=2&p_news=&p_sprachkz=D&p_uid=gast&p_aid=18704516&hlp_nr=2&p_janein=J). 2015.
- Robert - Koch - Institut. 2016. "RKI - Themenschwerpunkt Diabetes Mellitus." 2016. http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes_node.html).
- Robert-Koch-Institut. 2015. "Neue Daten Zu Krebs Deutschland." https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2015/11_2015.html.
- Rodgers, M., J. Nixon, S. Hempel, T. Aho, J. Kelly, D. Neal, S. Duffy, G. Ritchie, J. Kleijnen, and M. Westwood. 2006. "Diagnostic Tests and Algorithms Used in the Investigation of Haematuria: Systematic Reviews and Economic Evaluation." June 2006. <https://www.journalslibrary.nihr.ac.uk/hta/hta10180#/abstract>.
- Rose, Tracy L., and Matthew I. Milowsky. 2016. "Improving Systemic Chemotherapy for Bladder Cancer." *Current Oncology Reports* 18 (5): 27. <https://doi.org/10.1007/s11912-016-0512-2>.
- Rosenberg, Jonathan E., Jean Hoffman-Censits, Tom Powles, Michiel S. van der Heijden, Arjun V. Balar, Andrea Necchi, Nancy Dawson, et al. 2016a. "Atezolizumab in Patients with Locally Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma Who Have Progressed Following Treatment with Platinum-Based Chemotherapy: A Single Arm, Phase 2 Trial." *Lancet (London, England)* 387 (10031): 1909–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00561-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00561-4).
- 2016b. "Atezolizumab in Patients with Locally Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma Who Have Progressed Following Treatment with Platinum-Based Chemotherapy: A Single-Arm, Multicentre, Phase 2 Trial." *Lancet (London, England)* 387 (10031): 1909–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00561-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00561-4).
- Roudnicky, Filip, Lothar C. Dieterich, Cedric Poyet, Lorenz Buser, Peter Wild, Dave Tang, Peter Camenzind, Chien Hsien Ho, Vivianne I. Otto, and Michael Detmar. 2017a. "High Expression of Insulin Receptor on Tumour-Associated Blood Vessels in Invasive

Bladder Cancer Predicts Poor Overall and Progression-Free Survival.” *The Journal of Pathology* 242 (2): 193–205. <https://doi.org/10.1002/path.4892>.

2017b. “High Expression of Insulin Receptor on Tumour-Associated Blood Vessels in Invasive Bladder Cancer Predicts Poor Overall and Progression-Free Survival.” *The Journal of Pathology* 242 (2): 193–205. <https://doi.org/10.1002/path.4892>.

Roudnicky, Filip, Lothar Dieterich, Cédric Poyet, Lorenz Buser, Peter Wild, Dave Tang, Peter Camenzind, Chien Ho, Vivianne Otto, and Michael Detmar. 2017c. “High Expression of Insulin Receptor on Tumor-Associated Blood Vessels in Invasive Bladder Cancer Predicts Poor Overall and Progression-Free Survival: INSR Upregulation on Blood Vessels in Bladder Cancer.” *The Journal of Pathology* 242 (March). <https://doi.org/10.1002/path.4892>.

Roy, Hemant K., Bola F. Olusola, Dahn L. Clemens, William J. Karolski, Anne Ratashak, Henry T. Lynch, and Thomas C. Smyrk. 2002. “AKT Proto-Oncogene Overexpression Is an Early Event during Sporadic Colon Carcinogenesis.” *Carcinogenesis* 23 (1): 201–5. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.1.201>.

Ru, Yuanbin, Garrett M. Dancik, and Dan Theodorescu. 2011. “Biomarkers for Prognosis and Treatment Selection in Advanced Bladder Cancer Patients.” *Current Opinion in Urology* 21 (5): 420–27. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32834956d6>.

Ruzzene, Maria, Jessika Bertacchini, Alex Toker, and Sandra Marmioli. 2017. “Cross-Talk between the CK2 and AKT Signaling Pathways in Cancer.” *Advances in Biological Regulation* 64: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.03.002>.

Samani, Amir Abbas, Shoshana Yakar, Derek LeRoith, and Pnina Brodt. 2007. “The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights.” *Endocrine Reviews* 28 (1): 20–47. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0001>.

Schoenberg Fejzo, Marlana, and Dennis J. Slamon. 2001. “Frozen Tumor Tissue Microarray Technology for Analysis of Tumor RNA, DNA, and Proteins.” *The American Journal of Pathology* 159 (5): 1645–50.

Sciacca, Laura, Marco Prisco, An Wu, Antonino Belfiore, Riccardo Vigneri, and Renato Baserga. 2003. “Signaling Differences from the A and B Isoforms of the Insulin

Receptor (IR) in 32D Cells in the Presence or Absence of IR Substrate-1." *Endocrinology* 144 (6): 2650–58. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0136>.

Scosyrev, Emil, Katia Noyes, Changyong Feng, and Edward Messing. 2009. "Sex and Racial Differences in Bladder Cancer Presentation and Mortality in the US." *Cancer* 115 (1): 68–74. <https://doi.org/10.1002/cncr.23986>.

Sharma, Padmanee, Margitta Retz, Arlene Siefker-Radtke, Ari Baron, Andrea Necchi, Jens Bedke, Elizabeth R. Plimack, et al. 2017. "Nivolumab in Metastatic Urothelial Carcinoma after Platinum Therapy (CheckMate 275): A Multicentre, Single-Arm, Phase 2 Trial." *The Lancet. Oncology* 18 (3): 312–22. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30065-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30065-7).

Shaw, Leslie M. 2011. "The Insulin Receptor Substrate (IRS) Proteins." *Cell Cycle* 10 (11): 1750–56. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15824>.

Shen, Steven S., Carolyn L. Smith, Jer-Tsong Hsieh, Jiang Yu, Isaac Y. Kim, Weiguo Jian, Guru Sonpavde, Gustavo E. Ayala, Mamoun Younes, and Seth P. Lerner. 2006. "Expression of Estrogen Receptors- α and - β in Bladder Cancer Cell Lines and Human Bladder Tumor Tissue." *Cancer* 106 (12): 2610–16. <https://doi.org/10.1002/cncr.21945>.

Shinagare, Atul B., Nikhil H. Ramaiya, Jyothi P. Jagannathan, Fiona M. Fennessy, Mary-ellen Taplin, and Annick D. Van den Abbeele. 2011. "Metastatic Pattern of Bladder Cancer: Correlation with the Characteristics of the Primary Tumor." *AJR. American Journal of Roentgenology* 196 (1): 117–22. <https://doi.org/10.2214/AJR.10.5036>.

Sim, Allen, Tilman Todenhöfer, Johannes Mischinger, Omar Halalsheh, Omar Fahmy, Johannes Boettge, Steffen Rausch, et al. 2015. "Y Pouch Neobladder-a Simplified Method of Intracorporeal Neobladder after Robotic Cystectomy." *Journal of Endourology* 29 (4): 387–89. <https://doi.org/10.1089/end.2014.0507>.

Song, Gang, Gaoliang Ouyang, and Shideng Bao. 2005. "The Activation of Akt/PKB Signaling Pathway and Cell Survival." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (1): 59–71.

-
- Soria, Francesco, Laura-Maria Krabbe, Tilman Todenhöfer, Jakub Dobruch, Anirban P. Mitra, Brant A. Inman, Kilian M. Gust, Yair Lotan, and Shahrokh F. Shariat. 2019. "Molecular Markers in Bladder Cancer." *World Journal of Urology* 37 (1): 31–40. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2503-4>.
- "Spezialisierte Ambulante Palliativversorgung (SAPV) | Allgemein | Neuigkeiten." n.d. Accessed April 24, 2017. <https://www.dgpalliativmedizin.de/allgemein/sapv.html>.
- Spitzenverbände der GKV. 2008. "Gemeinsame Hinweise von DHPV Und DGP Zur Umsetzung Der SAPV."
- Stahl, Maximilian, Tae Kon Kim, and Amer M Zeidan. 2016. "Update on Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: New Discoveries and Therapeutic Opportunities." October 26, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5080639/>.
- Stein, John P., and Donald G. Skinner. 2006a. "Radical Cystectomy for Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results of a Standard Procedure." *World Journal of Urology* 24 (3): 296–304. <https://doi.org/10.1007/s00345-006-0061-7>.
- 2006b. "Radical Cystectomy for Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results of a Standard Procedure." *World Journal of Urology* 24 (3): 296–304. <https://doi.org/10.1007/s00345-006-0061-7>.
- Stenzl, Arnulf, Maximilian Burger, Yves Fradet, Lance A. Mynderse, Mark S. Soloway, J. Alfred Witjes, Martin Kriegmair, Alexander Karl, Yu Shen, and H. Barton Grossman. 2010. "Hexaminolevulinate Guided Fluorescence Cystoscopy Reduces Recurrence in Patients with Nonmuscle Invasive Bladder Cancer." *The Journal of Urology* 184 (5): 1907–13. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.06.148>.
- Stenzl, Arnulf, and Georgios Gakis. 2016. *Molekulare Marker Beim High-Grade Harnblasenkarzinom - Georgios; Stenzl Gakis (Arnulf) - Google Books*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. https://books.google.de/books?id=A8KbCwAAQBAJ&pg=PA9&lpg=PA9&dq=Kononen+et+al.+1998&source=bl&ots=onZ3ZGLqFU&sig=OY5u_IMVzadI-oNBYH5IH2JK0H-Y&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwjP_OCnkOLQAhXIDMAKHfh-dAlkQ6AEIRzAE#v=onepage&q=Kononen%20et%20al.%201998&f=false.

-
- Stephenson, Andrew J., Louis Kuritzky, and Steven C. Campbell. 2007. "Screening for Urologic Malignancies in Primary Care: Pros, Cons, and Recommendations." *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 74 Suppl 3 (May): S6-14.
- Stühler, Viktoria, Jan Moritz Maas, Jonas Bochem, Inês Anselmo da Costa, Tilman Todenhöfer, Arnulf Stenzl, and Jens Bedke. 2018. "Molecular Predictors of Response to PD-1/PD-L1 Inhibition in Urothelial Cancer." *World Journal of Urology*, October. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2538-6>.
- Sun, Ming, Zhaofu Chen, Shutao Tan, Caigang Liu, and Wenyan Zhao. 2018. "Knockdown of Fibrous Sheath Interacting Protein 1 Expression Reduces Bladder Urothelial Carcinoma Cell Proliferation and Induces Apoptosis via Inhibition of the PI3K/AKT Pathway." *OncoTargets and Therapy* 11: 1961–71. <https://doi.org/10.2147/OTT.S158275>.
- Sunshine, Joel, and Janis M. Taube. 2015. "PD-1/PD-L1 Inhibitors." *Current Opinion in Pharmacology* 23 (August): 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011>.
- "Suppression of ER β Signaling via ER β Knockout or Antagonist Protects against Bladder Cancer Development | Carcinogenesis | Oxford Academic." n.d. Accessed January 30, 2017. <https://academic.oup.com/carcin/article/35/3/651/2463117/Suppression-of-ER-signaling-via-ER-knockout-or>.
- "Survival Rates for Bladder Cancer." 2018. Cancer.Org. 2018. <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
- Szablewski, Leszek. 2014. "Diabetes Mellitus: Influences on Cancer Risk." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 30 (7): 543–53. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2573>.
- Tan, Winston, Stephen Boorjian, Pooja Advani, Sara Farmer, Christine Lohse, John Chevillie, Eugene Kwon, and Bradley Leibovich. 2015. "The Estrogen Pathway: Estrogen Receptor- α , Progesterone Receptor, and Estrogen Receptor- β Expression in Radical Cystectomy Urothelial Cell Carcinoma Specimens." *Clinical Genitourinary Cancer* 13 (5): 476–84. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.04.001>.

-
- Taniguchi, Cullen M., Brice Emanuelli, and C. Ronald Kahn. 2006. "Critical Nodes in Signalling Pathways: Insights into Insulin Action." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2): 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>.
- Taylor, Siân E., Pierre L. Martin-Hirsch, and Francis L. Martin. 2010. "Oestrogen Receptor Splice Variants in the Pathogenesis of Disease." *Cancer Letters* 288 (2): 133–48. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.06.017>.
- Teng, Jian, Zun-Yi Wang, David F Jarrard, and Dale E Bjorling. 2008. "Roles of Estrogen Receptor α and β in Modulating Urothelial Cell Proliferation." *Endocrine-Related Cancer* 15 (1): 351–64. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01255>.
- Teo, Min Yuen, and Jonathan E. Rosenberg. 2018a. "Nivolumab for the Treatment of Urothelial Cancers." *Expert Review of Anticancer Therapy* 18 (3): 215–21. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1432357>.
- 2018b. "Perioperative Immunotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer and Upper Tract Urothelial Carcinoma." *The Urologic Clinics of North America* 45 (2): 287–95. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2017.12.011>.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. 2014. "Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma." *Nature* 507 (7492): 315–22. <https://doi.org/10.1038/nature12965>.
- Thomsen, Alexander von. 2007. "Intrazelluläre Lokalisation des Östrogenrezeptors beta." Hamburg: Fachbereich Medizin der Universität Hamburg.
- Tseng, C.-H. 2011. "Diabetes and Risk of Bladder Cancer: A Study Using the National Health Insurance Database in Taiwan." *Diabetologia* 54 (8): 2009–15. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2171-z>.
- Turati, F, J Polesel, M Di Maso, M Montella, M Libra, M Grimaldi, A Tavani, D Serraino, C La Vecchia, and C Bosetti. 2015. "Diabetes Mellitus and the Risk of Bladder Cancer: An Italian Case–Control Study." *British Journal of Cancer* 113 (1): 127–30. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.178>.

-
- Ud, Rohr, Metka M, Nadjafi C, and Clementi W. 2008. "Wirkungen von Isoflavonen Beim Menschen - Überblick Und Diskussion." *Journal Für Gynäkologische Endokrinologie* 2 (3): 23–31.
- Uni Halle-Wittenberg. n.d. "Elektronisches Histologie Lernprogramm." Accessed June 8, 2018. http://histohal.uni-halle.de/histopatho/praepview.php?id=320&system=histo&selected_index=320&order_id=771§301§316§320&loc=lej.
- Van Obberghen, E., V. Baron, L. Delahaye, B. Emanuelli, N. Filippa, S. Giorgetti-Peraldi, P. Lebrun, et al. 2001. "Surfing the Insulin Signaling Web." *European Journal of Clinical Investigation* 31 (11): 966–77.
- Vella, Veronica, Agostino Milluzzo, Nunzio Massimo Scalisi, Paolo Vigneri, and Laura Sciacca. 2018. "Insulin Receptor Isoforms in Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113615>.
- Ventana Medical Systems, and Roche Diagnostics GmbH. 2011. "Roche DIA Kunden-Self-Service-Portal Und ELabDoc." June 28, 2011. https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/de/de/Documents?Type=Metadata&SortOption=Modify-Date&Text=optiVie&PageIndex=0&SourceSearchType=NewEntries&Filters%5B0%5D.Type=Language&Filters%5B0%5D.Value=de.
- Vigneri, Paolo, Francesco Frasca, Laura Sciacca, Giuseppe Pandini, and Riccardo Vigneri. 2009. "Diabetes and Cancer." *Endocrine-Related Cancer* 16 (4): 1103–23. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0087>.
- Vigneri, R., I. D. Goldfine, and L. Frittitta. 2016. "Insulin, Insulin Receptors, and Cancer." *Journal of Endocrinological Investigation* 39 (12): 1365–76. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0508-7>.
- Wang, Chun-Fang, Guo Zhang, Li-Jun Zhao, Wen-Juan Qi, Xiao-Ping Li, Jian-Liu Wang, and Li-Hui Wei. 2013a. "Overexpression of the Insulin Receptor Isoform A Promotes Endometrial Carcinoma Cell Growth." *PLoS ONE* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069001>.
- 2013b. "Overexpression of the Insulin Receptor Isoform A Promotes Endometrial Carcinoma Cell Growth." *PLoS ONE* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069001>.

-
- Webb, Ashley, and Anne Prof. Brunet. 2016. "Insulin Receptor Signaling Pathway | Cell Signaling Technology." September 2016. <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-irs&pathway=Insulin%20Receptor%20Signaling>.
- Wee, Ping, and Zhixiang Wang. 2017. "Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways." *Cancers* 9 (5). <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>.
- Wen, Jin, Han-zhong Li, Zhi-gang Ji, Wei-gang Yan, and Bing-bing Shi. 2011. "[Expressions of receptor tyrosine kinases mRNA and protein in carcinoma of bladder]." *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* 33 (4): 393–96. <https://doi.org/10.3881/j.issn.1000-503X.2011.04.009>.
- Widmark, Anders, Per Flodgren, Jan Erik Damber, Sverker Hellsten, and Eva Cavallin-Ståhl. 2003. "A Systematic Overview of Radiation Therapy Effects in Urinary Bladder Cancer." *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 42 (5–6): 567–81.
- Witjes, J. Alfred, Thierry Lebret, Eva M. Compérat, Nigel C. Cowan, Maria De Santis, Harman Maxim Bruins, Virginia Hernández, et al. 2017. "Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer." *European Urology* 71 (3): 462–75. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.020>.
- Wohlmann, geb Herzog, and Christina Susanne. 2009. "Nachweis Aktivierter Intrazellulärer Signalwege in Humanen Glialen Tumoren Durch Phosphorylierungs-Spezifische Immunhistochemie." In .
- Woldu, Solomon L., Aditya Bagrodia, and Yair Lotan. 2017. "Guideline of Guidelines – Non-Muscle Invasive Bladder Cancer." *BJU International* 119 (3): 371–80. <https://doi.org/10.1111/bju.13760>.
- Wolf, Rüdiger Friedrich. 2001. "Drainage von Erythrozyten Aus Dem Subarachnoidalraum in Lymphknoten - Eine Tierexperimentelle Untersuchung Zum Schädelhirntrauma." Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin. http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000000433.
- Wolff, Ingmar, Sabine Brookman-May, and Matthias May. 2015. "Sex Difference in Presentation and Outcomes of Bladder Cancer: Biological Reality or Statistical Fluke?" *Current Opinion in Urology* 25 (5): 418–26. <https://doi.org/10.1097/MOU.000000000000198>.

-
- Wu, Jinhua, Yolanda D. Tseng, Chong-Feng Xu, Thomas A. Neubert, Morris F. White, and Stevan R. Hubbard. 2008. "Structural and Biochemical Characterization of the KRLB Region in Insulin Receptor Substrate-2." *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (3): 251–58. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1388>.
- Xie, Hui, Mei Sun, Xiao-Bo Liao, Ling-Qing Yuan, Zhi-Feng Sheng, Ji-Cai Meng, Dan Wang, et al. 2011. "Estrogen Receptor A 36 Mediates a Bone-Sparing Effect of 17 β -Estradiol in Postmenopausal Women." *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (1): 156–68. <https://doi.org/10.1002/jbmr.169>.
- Xu, Chun-Xiao, Hong-Hong Zhu, and Yi-Min Zhu. 2014. "Diabetes and Cancer: Associations, Mechanisms, and Implications for Medical Practice." *World Journal of Diabetes* 5 (3): 372–80. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i3.372>.
- Xu, Sheng, Gui-Ming Zhang, Feng-Ju Guan, Da-Hai Dong, Lei Luo, Bin Li, Xiao-Cheng Ma, Jun Zhao, and Li-Jiang Sun. 2015. "The Association between Metabolic Syndrome and the Risk of Urothelial Carcinoma of the Bladder: A Case-Control Study in China." *World Journal of Surgical Oncology* 13 (August): 236. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0631-5>.
- Youssef, Ramy F., Anirban P. Mitra, Georg Bartsch, Peter A. Jones, Donald G. Skinner, and Richard J. Cote. 2009. "Molecular Targets and Targeted Therapies in Bladder Cancer Management." *World Journal of Urology* 27 (1): 9–20. <https://doi.org/10.1007/s00345-008-0357-x>.
- Zhang, Xiaolei, Xiao Yang, Chengdi Yang, Peng Li, Wenbo Yuan, Xiaheng Deng, Yidong Cheng, et al. 2016. "Targeting Protein Kinase CK2 Suppresses Bladder Cancer Cell Survival via the Glucose Metabolic Pathway." *Oncotarget* 7 (52): 87361–72. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13571>.
- Zhu, Zhaowei, Xianjin Wang, Zhoujun Shen, Yingli Lu, Shan Zhong, and Chen Xu. 2013. "Risk of Bladder Cancer in Patients with Diabetes Mellitus: An Updated Meta-Analysis of 36 Observational Studies." *BMC Cancer* 13 (June): 310. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-310>.

Zhu, Zhaowei, Xiaohua Zhang, Zhoujun Shen, Shan Zhong, Xianjin Wang, Yingli Lu, and Chen Xu. 2013. "Diabetes Mellitus and Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies." *PLoS ONE* 8 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056662>.

Zou, W., Z. Y. Li, C. L. Li, and Z. C. Cui. 2000. "[Protein kinase B and its role in the signal transduction pathway mediated by phosphoinositide 3-kinase]." *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan [Progress in Physiology]* 31 (2): 120–24.

9 Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich die bei der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen eingereichte Promotionsarbeit mit dem Titel:

**„Bedeutung der Insulinrezeptor- β -subunit für die Tumorbio-
logie des muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinoms vor dem
Hintergrund *Diabetes*-assoziierter Stoffwechselalterationen“**

selbstständig verfasst zu haben. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Zitate und Quellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben der Wahrheit entsprechen. Mir ist bewusst, dass Falschaussage geahndet wird.

Im Rahmen eines Verbundprojekts ‚Molekulare Untersuchungen zur Biologie des Harnblasenkarzinoms‘ wurde die Datenbank von Frau Dr. med. Katharina Teepe angelegt und die TMA-Herstellung sowie die immunhistochemische Färbung unter Mit-
hilfe von Frau Ursula Kühs in der urologischen Abteilung durchgeführt.

Herr Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter unterstützte mich bei der technischen Durchführung und der Manuskripterstellung.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse half mir Herr Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer und Tim Neumann. Alle Graphen und Tabellen, sowie die statistischen Ergebnisse, die in dieser Arbeit aufgeführt sind, wurden von mir selbst eigenständig errechnet und erstellt.

10 Danksagung

Dank sei Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl für die Überlassung des Forschungsthemas und die Möglichkeit in seiner Klinik die Forschungsräume zu nutzen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Tilman Todenhöfer. Ihm sei großer Dank für seine Unterstützung bei der Datenbewertung und für die hilfreichen wissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen zur Erarbeitung der Forschungsarbeit.

Herzlichsten Dank möchte ich Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter zusprechen. Er stand mir zu jeder Zeit zur Seite und hat mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingewiesen. Durch sein persönliches Mentoring konnte ich Hindernisse bewältigen und die anstehenden Projekte mit dem Vertrauen auf verlässliche Hilfe bearbeiten.

Zudem sei Dank dem ganzen Team der Urologie für die fachliche Unterstützung.

Dank sei Luca Ulrich, der mir diese Promotionsstelle vermittelt hat und mich vor allem in der Anfangszeit tatkräftig unterstützt hat und mir somit den Einstieg in meine Forschungsarbeit erleichtert hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für die moralische, wie auch fachliche Unterstützung bedanken. Dank eurer stetigen Motivation fand ich zu jeder Zeit den nötigen Ansporn diese Arbeit stetig voran zu bringen. Ohne euch hätte ich meine Promotion nicht mit dem notwendigen Elan und Freude an der Wissenschaft durchführen können.

