

Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen  
Institut für Pathologie und Neuropathologie  
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und  
Pathologische Anatomie

**Multiparametrische Klassifikation von  
nicht-muskelinvasiven papillären Urothelkarzinomen:  
Kombination von morphologischen,  
immunhistochemischen und molekularen Parameter  
zur  
verbesserten Risikobeurteilung**

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

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

**vorgelegt von**

**Hassas, Saki**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Becker

Tag der Disputation: 21.10.2024

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	<b>Nicht-muskelinvasives papilläres Urothelkarzinom der Harnblase</b>	<b>5</b>
1.1.1	Epidemiologie	5
1.1.2	Risikofaktoren	5
1.1.3	Symptomatik	6
1.1.4	Diagnostik	7
1.1.5	Klassifikation	10
1.1.6	Therapie	14
1.1.7	Prognose	15
1.1.8	Molekulare Klassifikation des Harnblasenkarzinoms	16
1.2	<b>Biomarker</b>	<b>20</b>
1.2.1	FGFR 3	20
1.2.2	PIK3CA	21
1.2.3	PTEN	21
1.2.4	STAG2	21
1.2.5	TP53	22
1.2.6	ERCC2	22
1.3	<b>Immunhistochemische Protein Marker</b>	<b>23</b>
1.3.1	Mitosemarker pHH3 und Proliferationsmarker mib-1	23
1.3.2	Zytokeratinmarker CK20	23
1.3.3	Tumorsuppressorprotein p53	24
1.3.4	Zellzyklusproteine p16 und p21	24
1.4	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	<b>Patientenkohorte</b>	<b>26</b>
2.2	<b>Histologische Klassifikation</b>	<b>27</b>
2.3	<b>Klinische Daten</b>	<b>28</b>
2.4	<b>Immunhistochemie</b>	<b>28</b>
2.5	<b>Next Generation Sequencing</b>	<b>31</b>
2.5.1	DNA Extraktion	31
2.5.2	DNA Quantifizierung	32
2.5.3	Amplifizierung	32
2.5.4	Gelelektrophorese	33
2.5.5	Targeted Next Generation Sequencing	34
2.5.6	Libraryerstellung AmpliSeq Panel:	35
2.5.7	High Prep – Aufreinigung	36
2.5.8	Quantifizierung der Libraries:	37
2.5.9	Mutationsanalyse	38
2.6	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>39</b>
2.6.1	Statistische Analyse	39
2.6.2	Cluster Analyse	40
2.7	<b>Materialliste</b>	<b>41</b>
2.7.1	Geräte	41
2.7.2	Kits	42

2.7.3	Reagenzien.....	42
2.7.4	Chemikalien.....	42
2.7.5	Antikörper.....	43
2.7.6	Puffer.....	43
2.7.7	Verbrauchsmaterialien.....	43
2.7.8	EDV-Programme und Onlinesoftware.....	43
2.7.9	Panel.....	44
2.7.10	Hersteller.....	45
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>45</b>
3.1	Patientenkohorte.....	45
3.2	Histologische Klassifikation.....	49
3.3	Immunhistochemie und Korrelation mit Grading.....	52
3.4	Mutationsanalyse.....	55
3.5	Cluster Analyse.....	57
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>61</b>
4.1	Grenzen der 2004/2016 WHO Klassifikation.....	61
4.2	Proteinexpression als prognostischer Marker.....	63
4.3	Mutationsanalyse der Fälle.....	64
4.4	Clusteranalyse der Fälle.....	65
4.5	Limitationen der Studie.....	67
4.6	Fazit.....	67
4.7	Zusammenfassung.....	68
<b>5</b>	<b><i>Abkürzungen</i></b> .....	<b>69</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>70</b>
<b>7</b>	<b><i>Erklärung zum Eigenanteil</i></b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b><i>Veröffentlichungen</i></b> .....	<b>78</b>
<b>9</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>78</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Nicht-muskelinvasives papilläres Urothelkarzinom der Harnblase

### 1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2018 erkrankten insgesamt 31.040 Personen in Deutschland an Harnblasenkrebs. Davon waren 18.270 invasive- (>T1) und 12.770 nicht-invasive Harnblasenkarzinome (Ta) bzw. Carcinoma in situ (Tis). Damit stellt das Harnblasenkarzinom die vierthäufigste Krebsform bei Männern und die zwölfhäufigste Krebsform bei Frauen dar. Bei knapp dreimal mehr Männern als Frauen wurde im Jahre 2018 die Diagnose Harnblasenkrebs gestellt [1]. Die Mortalität des Harnblasenkarzinoms in Deutschland im Jahr 2018 lag bei rund 5.700 Sterbefällen. Das Harnblasenkarzinom ist die zehnthäufigste Entität bei Männern und die fünfzehnthäufigste bei Frauen unter allen Krebssterbefällen 2018. Jährlich gibt es ungefähr 550.000 Todesfälle aufgrund von Harnblasenkarzinomen [2]. Das Harnblasenkarzinom ist, gemessen an den Kosten für die Behandlung pro Patienten, die Entität, mit der höchsten finanziellen Belastung für das öffentliche Gesundheitssystem. Dies bringt einen großen sozioökonomischen Effekt mit sich [3]. Die altersstandardisierte Inzidenz (ASI) des Harnblasenkarzinoms variiert weltweit signifikant. So ist die ASI in Europa und Nordamerika um ein Vielfaches höher als in Afrika, wohingegen die Mortalität-zu-Inzidenz-Ratio (MIR) in Afrika am höchsten ist. Grund dafür können verschiedene Faktoren sein, wie u. a. die Exposition gegenüber Risikofaktoren, das Geschlecht und der Standard des Gesundheitssystems. [4]

### 1.1.2 Risikofaktoren

Mit steigendem Alter steigt die Neuerkrankungsrate für das Harnblasenkarzinom kontinuierlich. Männer sind deutlich häufiger betroffen als Frauen, jedoch ist die Prognose des Krankheitsverlaufs bei Frauen schlechter. Neben dem Alter und dem Geschlecht gibt es einige spezifische Risikofaktoren für das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms.

Eines der stärksten Risikofaktoren ist das Tabakrauchen [5]. Sowohl aktives als auch passives Rauchen von Tabak, haben einen Einfluss auf die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms. Tabakrauchen ist für 50 % aller Fälle bei Männern und für 20 % aller Fälle bei Frauen mitverantwortlich. Ein weiterer Risikofaktor ist die regelmäßige Exposition gegenüber bestimmten chemischen Stoffen, oft im Rahmen des beruflichen Alltags. Darunter fallen aromatische Amine, wie 4,4'-Methylenebis, die in Fungiziden, Lacken, Textilien, Metallen, Gummi, Leder, Plastikprodukten und Haarfärbemitteln vorkommen [6]. Ein weiterer Risikofaktor für das Auftreten von Harnblasenkarzinomen ist eine Exposition gegenüber hohen Dosen von Arsen. Hohe Dosen können im Essen, im Trinkwasser, in der Luft oder im Tabak enthalten sein. Darüber hinaus sind einige Arzneimittel mit einem höheren Risiko für das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms assoziiert. Zu diesen Arzneimitteln gehören u. a. das Immunsuppressivum Cyclophosphamid [7] und das Antidiabetikum Pioglitazon [8]. Des Weiteren sind Bestrahlungen im kleinen Becken, z. B. im Rahmen eines Prostatakarzinoms, ein Risikofaktor für das Entstehen eines Harnblasenkarzinoms. Außerdem geht man davon aus, dass es genetische Risikofaktoren für das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms gibt [9].

### 1.1.3 Symptomatik

Man sollte beachten, dass Symptome nicht zwangsläufig auf ein Karzinom hinweisen, da sie recht unspezifisch sein können. Nicht zwangsläufig geht ein Tumor mit Symptomen einher, und Symptome geben meist Hinweise auf ein bereits fortgeschrittenes Tumorstadium. Das führende Symptom bei Patienten mit einem Harnblasenkarzinom ist die Makrohämaturie. Diese tritt aber zumeist in fortgeschrittenen Stadien auf. Über zwei Drittel der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom haben eine Makrohämaturie [10]. Der positive prädiktive Wert liegt für Männer bei etwa 8 % und für Frauen bei ca. 4 %. Außerdem haben etwa 10-15 % der Patienten mit einer asymptomatischen Mikrohämaturie ein Karzinom der Harnblase bzw. der harnableitenden Wege [11]. Darüber hinaus treten bei jedem vierten Patienten irritative Symptome auf. Darunter fallen Pollakisurie, Dysurie, Drangsymptomatik und eine erhöhte Harnfrequenz. In 40 % der Fälle ist eine begleitende Harnwegsinfektion ursächlich für die irritativen

Symptome. Weitere Ursachen irritativer Symptome sind reduzierte Blasenkapazitäten und Blasenhalsostruktionen durch lokales Tumorwachstum oder unspezifische Entzündungen im Bereich der Harnblase. Symptome wie Schmerzen oder Abflussstörungen treten meist bei fortgeschrittenen Tumorstadien auf und können im Verlauf die Ausbildung einer Hydronephrose verursachen [12]. Weitere unspezifische Symptome sind abdominelle Beschwerden, Obstipationen, Leukozytose, erhöhte Entzündungswerte oder ein erhöhtes Serum Kreatinin [13].

#### 1.1.4 Diagnostik

Grundlegend gilt bei der Diagnostik von Harnblasenkarzinomen, die Diagnosestellung mithilfe mehrerer Komponenten: die Anamnese, einschließlich der Risikobeurteilung für Harnblasenkarzinome, die klinische Untersuchung sowie invasive und nicht-invasive Untersuchungen, einschließlich radiologischer Bildgebung. Die histopathologische zytologische Untersuchung zählt als Goldstandard der Diagnostik von papillären Urothelkarzinomen der Harnblase. Neben der histopathologischen Untersuchung gibt es weitere zusätzliche Möglichkeiten der Diagnostik von Urothelkarzinomen der Harnblase. Dazu gehören die Sonografie sowie weitere bildgebende Untersuchungen und die Zystoskopie, die einen diagnostischen und therapeutischen Stellenwert einnimmt [14]. Die körperliche Untersuchung spielt bei der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms eine untergeordnete Rolle. Lediglich im fortgeschrittenen Stadium kann bei muskelinvasivem Blasenkarzinom eine bimanuelle Untersuchung in Narkose durchgeführt werden, um festzustellen, ob die Blase im kleinen Becken bei wandüberschreitendem Wachstum fixiert ist [15].

##### 1.1.4.1 Histopathologie

Neben allen verfügbaren diagnostischen Mitteln und neuen Verfahren wie der Mutationsanalyse, dem Einsatz von bildgebenden Verfahren oder auch der Nutzung von Nanomedizin stellt die histopathologische Untersuchung weiterhin den Goldstandard der Diagnostik dar, mit einer hohen Spezifität. Dabei wird eine Gewebeprobe der Harnblase gewonnen, gefärbt und vom Pathologen

mikroskopisch untersucht. Die Gewebeproben können durch eine Biopsie, oder von reseziertem Gewebematerial, z. B. nach einer transurethralen Blasentumorresektion (TUR-B) oder auch nach einer Zystektomie, gewonnen werden. Die Entnahme des Gewebematerials erfolgt meist im Rahmen der Zystoskopie der Harnblase [14].

#### 1.1.4.2 Zystoskopie

Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom folgt eine Zystoskopie, bei der eine histologische Sicherung erfolgt. Diese findet im Rahmen einer TUR-B statt, die eine Erfassung des M. detrusor vesicae berücksichtigt, um eine mögliche Muskelinvasion beurteilen zu können. Nach Möglichkeit sollte der Tumor vollständig entfernt werden („en bloc“). Bei der TUR-B sollten die Größe des Tumors, die Lokalisation und die Anzahl der Tumoren dokumentiert werden [16]. Bei fehlender Muskelinvasion im transurethralen Resektat der Harnblase muss außer einer sonografischen Untersuchung keine weitere bildgebende Abklärung des Harntrakts erfolgen. Entscheidend für das weitere Vorgehen bei nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinome (NMIBC) ist die Klassifizierung des Tumors durch den Pathologen, der die Tumore nach der WHO-Klassifikation 2004/2016 in PUNLMP, Low-Grade oder High-Grade einteilt. Falls jedoch eine Muskelinvasion erkennbar ist, sollten weitere bildgebende Untersuchungen erfolgen [17].

#### 1.1.4.3 Zytologie

Bei asymptomatischer Mikrohämaturie kann ein Erythrozyten-Nachweis mithilfe eines Urin-Teststreifens oder einer Urinmikroskopie erfolgen. Bei High-Grade-Tumoren kann eine Urinzytologie durchgeführt werden. Dabei werden gefärbte Urinausstriche mikroskopisch auf das Vorhandensein von malignen Urothelzellen untersucht. Die Aussagekraft ist abhängig von der Erfahrung des Untersuchers, der Qualität des Urins und seiner Verarbeitung sowie von der Tumorgröße. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit einer positiven Zytologie bei ausgedehnten Tumorbefunden [18]. Die Spülzytologie ist ein manipulatives Verfahren, weshalb oft Artefakte als reaktive Zellveränderungen auftreten. Deshalb wird das

sogenannte Mehrschrittverfahren angewendet, bei dem vor dem eigentlichen Verfahren eine Urinprobe aus der Harnblase und dem oberen Abschnitt des Harntrakts, der noch nicht von der Spülzytologie betroffen ist, entnommen wird. Diese Proben helfen bei der Beurteilung fraglicher Befunde. Nach der Uringewinnung werden die Zellen gefärbt, dabei nutzt man v. a. die Papanicolaou-Färbung, und mithilfe des Mikroskops beurteilt [19]. Bei der Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop werden diese auf Malignitätskriterien hin untersucht, wobei die 2004/2016-WHO-Klassifikation zugrunde liegt. Einige dieser WHO-Kriterien für High-Grade-Befunde, umfassen eine zugunsten des Nukleus verschobene Kern-Plasma-Ratio, viele atypische Mitosen, Hyperchromasie, Transparenzverlust des Zellkerns und prominente polymorphe Nukleolen [20].

Bei der selektiven Spülzytologie aus der Harnblase liegt die Gesamtsensitivität zwischen 29-58,8 %. So ist die selektive Spülzytologie aus dem Nierenbecken oder der Harnleiter, der aus der Harnblase, mit einer Gesamtsensitivität von 43-79%, deutlich überlegen. Außerdem ist die Sensitivität abhängig vom Tumorgrad. Am geringsten ist die Sensitivität der Spülzytologie aus der Harnblase bei G1 Tumoren mit 10-40 %, bei G2 Tumoren liegt diese bei 55 % und am besten ist die Detektionsrate bei G3 Tumoren, mit einer Sensitivität von 69-100 % [21].

#### 1.1.4.4 Sonographie

Zur Ursachenfindung einer Makrohämaturie oder einer Harnstauung kann eine Sonographie zielführend sein. Die Sonographie kann hierbei als Primärdiagnostik zur groben Abklärung von Flankenschmerzen oder Makrohämaturie dienen. Im Rahmen der Sonographie können größere Tumore der Harnblase, eine Hydronephrose oder Infiltrationen der Niere erkannt werden. Kleinere Infiltrationen bzw. Tumore können jedoch nicht detektiert werden, weshalb es weiterer diagnostischer Maßnahmen bedarf.

#### 1.1.4.5 Mehrschicht-CT-Urographie

Für die Detektion von Harnblasenkarzinomen, sowie zur Detektion von Tumoren des oberen Harntraktes, kann die Mehrschicht-CT-Urographie (MSCTU)

eingesetzt werden. Bei der MSCTU wird das Prinzip der Ausscheidungsurographie angewandt, kombiniert mit der Herstellung axialer Schnittbildreihen in der Computertomographie. Daraus lassen sich weitere Schnittebenen rekonstruieren. Polypoiden Läsionen mit einem Durchmesser von 5-10 mm haben eine Sensitivität von 96 %, bei einer Größe von 3-5 mm liegt diese bei 89 % und am geringsten ist sie bei kleineren Läsionen <3 mm, mit nur 40%. Im Vergleich zur klassischen Ausscheidungsurographie ist die Strahlenbelastung bei der MSCTU höher [22].

#### 1.1.4.6 MR-Urographie

Als Alternative zur MSCTU steht die MR-Urographie zur Verfügung. Ein Vorteil dieser Methode ist die fehlende Strahlenbelastung. Die Sensitivität bei der Detektion von Tumoren unter 2 cm liegt bei 74% [23]. Da die Testempfindlichkeit niedriger und die Kosten höher sind als die MSCTU, wird die MR-Urographie nur bei speziellen Fragestellungen angewendet. Beispiele hierfür sind: eine Unverträglichkeit gegenüber jodhaltigem Kontrastmittel, Schwangerschaft oder eine eingeschränkte Nierenfunktion [24].

#### 1.1.5 Klassifikation

Harnblasenkarzinome können in muskelinvasive und nicht-muskelinvasive unterschieden werden. Nach der TNM-Klassifikation werden 70 % aller NMIBC als pTa, 20 % als pT1, und die restlichen 10 % als pTis klassifiziert [25]. Papilläre NMIBC, die die Lamina propria infiltrieren, werden als pTa klassifiziert. Sobald der Tumor das subepitheliale Bindegewebe erreicht, spricht man von einem pT1-Tumor. CIS-Tumore (pTis) beschränken sich auf die Mukosa und können an mehreren unterschiedlichen Orten der Harnblase auftreten. Muskelinvasive Blasenkarzinome (MIBC) können, abhängig von der Tiefe bzw. dem Ausmaß der Muskelinfiltration, in pT2a-pT4b unterschieden werden [26].

T	Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	Carcinoma in situ
	Ta	Nicht-invasiver papillärer Tumor
	T1	Tumor infiltriert subepitheliales Gewebe
	T2	Tumor infiltriert die Muskulatur
	-a	-Infiltration der oberflächlichen Muskulatur
	-b	-Infiltration der tiefen Muskulatur
	T3	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
	-a	-Mikroskopisch
	-b	-Makroskopisch
N	T4	Tumor infiltriert
	-a	-Prostata, Uterus, Vagina
	-b	-Becken-, oder Bauchwand
N	Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0	Keine regionalen Lymphknoten
	N1	Solitäre Lymphknotenmetastase im Becken (hypogastrisch, obturatorisch, präsakral, Bereich der Arteria iliaca externa)
	N2	Multiple Lymphknotenmetastasen im Becken
	N3	Lymphknotenmetastasen im Bereich der Arteria iliaca communis
M	Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen vorhanden

Tab. 1: Übersicht der TNM-Klassifikation von Harnblasenkarzinomen [27].

Die Mehrheit der Harnblasenkarzinome sind Urothelkarzinome. Seltener treten squamöse-, kleinzellige-, Adenokarzinome oder Sarkome auf [28]. 70-75 % aller urothelialen Harnblasenkarzinome sind nicht-invasiv papillär. Männer sind dreimal häufiger betroffen als Frauen. Das Alter der Patienten liegt im Median bei 70 Jahren. Über 50 % werden als Low-Grade klassifiziert, mit einem hohen Rezidivrisiko, aber geringem Invasionsrisiko von weniger als 15 %. Die häufigste Lokalisation ist die laterale und posteriore Wand der Harnblase. Über die letzten Jahrzehnte hinweg, war es das Ziel der Pathologie, eine Morphologie-, und Zytologie-basierte Klassifikation für Urothelkarzinome der Harnblase zu etablieren, bei der die inter-, und intraobserver variability so gering wie möglich sind. Die ursprüngliche Klassifikation von 1973 der „International Society of Urological Pathology (ISUP)“ wurde von der WHO-Klassifikation 2004/2016 abgelöst. Die ISUP-Klassifikation von 1973 teilte nicht-invasive Urothelkarzinome der Harnblase in G1, G2 und G3 ein. Die neue Klassifikation der WHO von

2004/2016 teilt Urothelkarzinome der Harnblase in PUNLMP, Low-Grade und High-Grade ein. Dabei erfolgt die Klassifikation anhand architektureller (papilläre Struktur, Urothel Schichten) und zytologischer (Mitosen, Chromatin, Nukleus, Nukleolus, Kern-Plasma Ratio) Eigenschaften [29]. Die histopathologische Diagnostik findet mit einem Lichtmikroskop statt. Dabei wird der histopathologische Schnitt in verschiedenen Auflösungen betrachtet und interpretiert. Architekturelle Eigenschaften werden in niedriger Vergrößerung (100x) betrachtet, wobei zytologische Eigenschaften in mittlerer (200x) bis hoher (400x) Vergrößerung betrachtet und interpretiert werden. Die architekturellen Eigenschaften der histopathologischen Schnitte umfassen die papillären Strukturen und die Schichten des Urothels. Die papillären Strukturen werden anhand ihres Aufbaus interpretiert. Dabei gelten schlanke, nicht verzweigte Papillen als weniger und verzweigte, teils fusionierte, unterschiedlich große Papillen, als stärker maligne. Der weitere architekturelle Parameter ist die Dicke des Urothels. Dabei achtet der Untersucher auf die Anzahl der Schichten des Urothels. Eine hohe Anzahl an Urothel Schichten, steht für ein malignes Geschehen. Dies wird bei der Klassifikation der nicht-invasiven papillären Urothelkarzinomen der Harnblasen berücksichtigt. Neben den architekturellen Eigenschaften, werden zytologische Eigenschaften bei der histopathologischen Klassifikation berücksichtigt. Dabei spielen die Anzahl und die Art der Mitosen eine Rolle. Eine hohe Anzahl an Mitosen und eine atypische Form, sind Indikatoren für ein höheres Grading der Tumore. Außerdem spielt die Verteilung des Chromatins eine Rolle in der Tumorklassifikation. Eine dichte Verteilung des Chromatins ist mit einer höheren Klassifikation assoziiert. Bei der histopathologischen Untersuchung werden atypisch, große Nuklei, sowie prominente Nukleoli als Malignitätszeichen gewertet. Des Weiteren, wird bei der Klassifikation von nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinomen der Harnblase auf die Kern-Plasma-Ratio geachtet. Ein zu Gunsten des Kerns verschobenes Kern-Plasma Verhältnis wird als Zeichen, für ein höheres Grading interpretiert.

WHO 1973		WHO 2004/2016
G1	Gut differenziertes urotheliales papilläres Karzinom	PUNLMP = papilläre urotheliale Neoplasie von niedrig-malignem Potential
		Low-Grade (LG-PUC)
G2	Mäßig differenziertes urotheliales papilläres Karzinom	
		High-Grade (HG-PUC)
G3	Schlecht differenziertes urotheliales papilläres Karzinom	

Tab. 2: Vergleich WHO 1973- und WHO 2004/2016- Klassifikation von Urothelkarzinomen [30].

“Papillary Urothelial neoplasm of low-malignant Potential”, kurz “PU-NLMP” ist ein papillärer urothelialer Tumor mit minimalen Atypien. Die jährliche Inzidenz liegt bei 3 Fällen pro 100.000 Einwohner, Männer sind fünfmal häufiger betroffen als Frauen und das mittlere Alter liegt bei 64,6 Jahren. Bei niedriger Vergrößerung erscheinen „PUNLMP“ Fälle als papilläre Strukturen, welche von Urothel bedeckt sind. Dabei ist das Urothel dicker und zellreicher als normales Urothel. Weitere architekturelle Anomalitäten sind nicht zu erkennen, da kein Verlust der Zellpolarität besteht. Fälle, die als PUNLMP klassifiziert werden, haben weitestgehend eine monoton erscheinende Zytologie. Es sind nur wenige Irregularitäten zu finden, wie leicht vergrößerte Nuklei, Nukleoli sind unauffällig oder nicht aufzufinden, das Chromatin ist gleichmäßig verteilt und normochrom, Mitosen sind begrenzt auf die Basalzellschicht, oder nicht vorhanden. Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass das Rezidiv Risiko für PUNLMP-Fälle niedriger ist, als das von Low-Grade Fällen. Es liegt kein Risiko der Invasion bei PUNLMP Fällen vor, jedoch ein höheres Risiko für Rezidiv. Deshalb werden PUNLMP Fälle klinisch, wie Low-Grade Fälle behandelt. Einige Studien empfehlen weniger Folgeuntersuchungen bei PUNLMP Fällen, als bei Low-Grade Fällen zu veranlassen [29]. Nicht-muskelinvasive Urothelkarzinome der Harnblase, welche als Low-Grade klassifiziert werden, haben schlanke, verzweigte Papillen und sehen bei einer niedrigen Auflösung relativ geordnet aus. Bei mittlerer Vergrößerung des Mikroskops fällt ein Verlust der Zellpolarität auf, sowie moderate nukleäre Atypien. Mitosen können vorhanden sein. Bei der

Diagnosestellung urothelialer Harnblasenkarzinome werden ca. 75 % aller Fälle als Low-grade, nicht-muskelinvasiv, papillär klassifiziert. [31]

High-Grade Tumore, haben stark verzweigte Papillen, die ineinander verschmelzen. Deshalb haben High-Grade Tumore ein solid-exophytisches Aussehen. Nukleare Irregularitäten, pleomorphe Nuklei, prominente Nukleoli und eine Vielzahl an Mitosen, können bereits bei niedriger bis moderater Vergrößerung gesehen werden. Die Dicke des Urothels ist variabel und schwankt über den Tumor hinweg. Die Risiken für Rezidiv und Invasion sind bei High-Grade Fällen am höchsten.

#### 1.1.6 Therapie

Beim NMIBC ist die TUR-B entscheidend, sowohl für die Diagnose als auch für die Therapie. Falls die primäre TUR inkomplett war, oder es sich um pT1-Tumoren handelt, sollte innerhalb von 6 Wochen nach der ersten Resektion eine weitere TUR erfolgen. Die Transurethrale Resektion ist eine urologische Operationstechnik, bei der das erkrankte Gewebe bzw. das zu resezierende Gewebe endoskopisch entfernt wird. Dabei gelangt man mithilfe eines Resektoskops, meist eines Rückspülresektoskops mit einem Außen- und Innenschaft, über die Harnröhre zum Zielgewebe. Der Außenschaft besteht aus einem Kanal für die Flüssigkeitszufuhr und einem für die Absaugung. Der Innenschaft enthält die Optik für die Beleuchtung und bildliche Darstellung über eine angeschlossene Videokamera sowie die Resektionsschlinge. Über die Drahtschlinge für die Resektion läuft elektrischer Strom, mit dem das Zielgewebe abgetragen werden kann. Beim Zielgewebe kann es sich bei der TUR um Harnblasengewebe oder Gewebe der Prostata handeln. Außerdem können auftretende Blutungen kauterisiert werden [32, 33].

Vor allem bei unifokalen Urothelkarzinomen der Harnblase kann postoperativ eine Chemotherapie-Frühinstillation mit z. B. Mitomycin C erfolgen [34]. Kommt es zu Rezidiven der Urothelkarzinome der Harnblase unter Chemotherapie-Instillation, kann eine BCG-Instillationstherapie für mindestens ein Jahr erfolgen. Je nach individuellem Risikoprofil kann eine Erhaltungstherapie mit Chemotherapie-Instillation das Rezidivrisiko senken. Bei NMIBC HG-PUC kann

eine Zystektomie in Erwägung gezogen werden. Falls diese nicht indiziert ist, kann alternativ eine BCG-Instillationstherapie erfolgen [35]. Bei Muskelinvasion durch das Blasenkarzinom ist eine radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie die kurative Behandlungsmethode der Wahl. Im Rahmen dessen sollten zusätzlich bei Männern die Prostata und die Samenblasen, bei Frauen der Uterus, die Adnexen und Anteile der vorderen Vaginalwand, entfernt werden. Die radikale Zystektomie sollte möglichst innerhalb von drei Monaten nach Diagnosestellung erfolgen. Alternativ zur radikalen Zystektomie steht die TUR mit anschließender Radiochemotherapie. Diese Therapieoption ist geeignet für Patienten mit frühen Tumoren ohne Metastasen oder tumorassoziierte Komplikationen (z. B. Hydronephrose) sowie für Patienten, bei denen erwartet wird, dass eine TUR zu einer vollständigen Tumorentfernung führt (cT2–4, cN0/NX, M0) [36]. Eine Cisplatin-basierte neoadjuvante Therapie kann sowohl bei metastasierten als auch bei lokal muskelinvasiven Urothelkarzinomen der Harnblase durchgeführt werden. Dabei kann das MVAC Schema mit Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin benutzt werden oder das GC-Schema mit Gemcitabin und Cisplatin [37]. Ziel der neoadjuvanten Therapie ist die Größenreduktion des Tumors mit anschließendem invasivem Eingriff. Bei positivem Lymphknotenstatus erfolgt eine Cisplatin-basierte adjuvante Chemotherapie. Alternativ kann eine Immuntherapie durchgeführt werden, bei der Immuncheckpoint Inhibitoren, wie z. B. der PD(L)-1-Inhibitor Pembrolizumab, eingesetzt werden [38, 39].

#### 1.1.7 Prognose

Nach der 2004/2016-WHO-Klassifikation werden nicht-invasive Urothelkarzinome der Harnblase in PUNLMP, Low-Grade und High-Grade eingeteilt. Fälle, die als PUNLMP klassifiziert werden, haben eine Rezidivrate von 25 % und ein geringes Invasionsrisiko von 1-3 %. Low-Grade Fälle haben eine Rezidivrate von 31-78 %, und eine geringe Invasionsrate von etwa 5 %. Etwa drei Viertel aller High-Grade Tumoren zeigen ein Rezidiv, und rund die Hälfte werden invasiv [25]. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit einem nicht-invasiven Harnblasenkarzinom liegt bei 90 %. Die Progressionsrate von nicht-

muskelinvasiven zu muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen liegt bei 10-20 % [40]. Diese Patienten können bisher nicht genau und frühzeitig identifiziert werden [41]. Die 5-Jahresüberlebensrate bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen ist deutlich geringer und liegt bei 60%. Bei bereits metastasierten Karzinomen beträgt diese nur 10% [42]. Multiple Lokalisationen, große Tumore (>5 cm), Tumorrezidive in der Anamnese und kurze krankheitsfreie Phasen sind mit einem hohen Risiko für Rezurrenz assoziiert [43]. Der wichtigste Prognosefaktor ist die Graduierung des Tumors nach dem TNM-Schema sowie die genaue histologische Klassifikation. Weitere Faktoren, die wichtig für die Prognose sind, umfassen: Tumorgöße, Anzahl der Tumoren, intravesikale Therapien, Ansprechen auf die BCG-Therapie, Alter, Geschlecht, lymphovaskuläre Invasion und Tiefe der Invasion der Lamina propria. [44]. Außerdem geben bestimmte Genmutationen und Proteinexpressionen Hinweise auf die Prognose von nicht-invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase. Faktoren, welche mit einem erhöhten Rezurrenz Risiko korrelieren sind ein erhöhter Proliferationsmarker *mib-1* und eine hohe Anzahl an Mitosen, welche mithilfe des Antikörpers *p-HH3* angefärbt werden können [45]. Außerdem sind Mutationen im *PTEN*-, sowie im *TP53*-Gen mit einem hohen Rezurrenz- und Invasionsrisiko assoziiert. Marker, welche mit einem niedrigen Rezurrenz Risiko assoziiert sind, umfassen Mutationen im *FGFR3*- und *PIK3CA*-Gen [46].

WHO 2004/2016	PUNLMP	Low-Grade	High-Grade
Rezurrenz Risiko	25%	31-78%	78%
Invasionsrisiko	1-3%	1-3%	45%

Tab. 3: Rezurrenz- und Invasionsrisiko der einzelnen Tumorgrade nach der 2004/2016-WHO Klassifikation (in % [47]).

#### 1.1.8 Molekulare Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

Durch den Fortschritt in den letzten Jahren im Bereich des Next Generation Sequencing (NGS) liegt der Fokus bei der Diagnose und Klassifikation von Tumoren der Harnblasen, neben den morphologischen Eigenschaften, immer mehr auf den molekularen Eigenschaften der Tumore. Im letzten Jahrzehnt gab es große Fortschritte in der molekularen Genforschung, sodass wir ein besseres

Verständnis der Tumorbiologie von Harnblasenkarzinomen erlangen konnten. Nichtsdestotrotz gibt es keinen Tumormarker, der derzeit in der klinischen Praxis zur Behandlung und Diagnostik des Urothelkarzinoms standardmäßig eingesetzt wird. In der UROMOL-Studie wurden NMIBC je nach molekularem Profil in drei Klassen eingeteilt [48]. Die Lund University teilte Urothelkarzinome der Harnblase anhand ihres molekularen Profils in fünf verschiedene Gruppen ein. Zu diesen gehören u. a.: Urobasal A, genomisch instabil, Urobasal B und squamös zellartig [49]. Diese Einteilung korrespondiert mit der molekularen Klassifikation von der North Carolina University, welche eine Einteilung in den basalen und luminalen Subtyp vornimmt. Die molekulare Klassifikation der Tumore hat an Bedeutung gewonnen, da sie mit der klinischen Prognose der Patienten korreliert. [50]. Urotheliale Karzinome der Harnblase werden in verschiedenen Studien anhand ihres molekularen Profils unterschiedlich eingeteilt. Die University of Singapore reanalysierte die Genexpressionsdaten von 2411 öffentlich zugänglichen Fällen. Dabei wurden Subtypen nach dem Muster von der „UROMOL-“, der „IMvigor210-“ und „The Cancer Genome Atlas-“ Studie identifiziert. Es konnten dabei sechs Subgruppen identifiziert werden [51]. Diese Subgruppen unterschieden sich in Ihrer mittleren Überlebensrate sowie in ihren molekularen Parametern. Die verschiedenen Subtypen waren der squamös zellartige, mesenchymale, neuronale, luminale HER2-assoziierte, und der papilläre Subtyp. Der squamös zellartige Subtyp, der auch in der Studie der Lund University beschrieben wird, hat die niedrigste mittlere Überlebensrate von 20,6 Monaten nach Erstdiagnose. Neben dem squamös zellartigen Subtyp haben mesenchymale Subtypen eine schlechte Prognose, mit einer mittleren Überlebensrate von 86,6 Monaten nach Erstdiagnose. Beide Subtypen kommen häufig in muskelinvasiven Karzinomen der Harnblase vor [52]. Squamös zellartige Tumore zeigen eine hohe *PD1*, *CTLA4*-Expression und Makrophagen M2 Infiltration, wohingegen mesenchymale Subtypen eine erhöhte *AXL*-Expression zeigen. Auch der neuronale Subtyp ist häufig bei muskelinvasiven Karzinomen der Harnblase zu finden und zeigt eine erhöhte Expression von *WNT/β-catenin*, die mittlere Überlebensrate liegt bei 87 Monaten. Der luminale Subtyp findet sich vor allem bei nicht-muskelinvasiven Karzinomen der

Harnblase und zeigt vermehrt *KRAS*, *MPAK* und *KMT2 C/D* Mutationen. Die mittlere Überlebensrate beträgt 91,7 Monate. Der HER2-Subtyp zeigt oft Mutationen im *ERCC2* Gen und ist gleichmäßig auf muskel-, und nicht-muskelinvasive Urothelkarzinome der Harnblase verteilt. Die Prognose für diesen Subtyp ist mit einer mittleren Überlebensrate von 107,7 Monaten vergleichsweise gut. Die beste Prognose haben papilläre Typen, mit einer Überlebensrate von mehr als 135 Monaten. Der papilläre Subtyp hat die beste Prognose mit einer Überlebensrate von mehr als 135 Monaten. Dieser Subtyp kommt fast ausschließlich in nicht-muskelinvasiven Typen vor und zeigt häufig Mutationen im *FGFR3*-Gen. Je nach molekularem Profil gibt es signifikante Unterschiede in der Prognose. Der molekulare Subtyp kann zudem entscheidend für das Ansprechen onkologischer Therapien entscheidend sein. So wurde in einer Studie von 2022, die im „European Urology Journal“ publiziert wurde, dass Ansprechen verschiedener molekularer Subtypen auf eine neoadjuvante Chemotherapie untersucht. Dabei sprachen luminale oder genomisch instabile Subtypen besser an als squamös zellartige [53]. Die Korrelationen von molekularem Tumorprofil und mittlerer Überlebenszeit ist nochmals in Tab. 4 festgehalten. NMIBC haben nur wenige zytogenetische Veränderungen, während MIBC genomisch instabiler sind [54]. Man geht von mindestens zwei verschiedenen Wegen bei der Entwicklung von Urothelkarzinomen der Harnblase aus [20]. Nach der Zwei-Wege-Theorie gibt es zwei verschiedene Gruppen von Tumoren. Die erste Gruppe umfasst Tumore, die dem papillären Weg folgen. Beim papillären Weg kommt es von einer Hyperplasie des Epithels zu einem papillären, meist nicht-invasiven Tumor. Diese Gruppe umfasst zumeist Fälle, die als LG-PUC klassifiziert werden. Diese machen ca. 70% aller Urothelkarzinome aus. Jedoch gehören auch einige High-Grade Tumoren, die zwar nicht-muskelinvasiv sind, aber eine Progression zu einer invasiven Form durchlaufen, zu der Gruppe, die dem papillären Weg folgen. Die Tumore dieser Gruppe sind meist genomisch stabil und weisen einen diploiden Karyotyp aus [41]. Hierbei fallen *Gain of function* Mutationen auf, bei Onkogenen wie dem Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (*FGFR-3*), dem *H-RAS* Protoonkogen, und der Phosphoinositid-3-Kinase (*PI3K*). *FGFR3* Mutationen treten häufiger bei

Low-Grade NMIBC als bei high-grade NMIBC oder MIBC auf. Tumore, die *FGFR3* Mutationen haben, sind assoziiert mit einem geringeren Rezidiv Risiko und einer besseren Prognose [55]. Fälle, bei denen eine Mutation im *PIK3CA* Gen zu finden ist, haben ein geringeres Invasionsrisiko [56]. Außerdem erkennt man häufiger *STAG2* Mutationen in Low-Grade NMIBC. Dieser ist ein prognostisch günstiger Faktor mit einem geringeren Risiko für Invasion und Rezidiv beim Urothelkarzinomen der Harnblase [57].

Die zweite Gruppe folgt dem nicht-papillären Weg. Sie umfasst Tumore, welche invasiv sein können, flache CIS, welche Vorläufer der invasiven Tumore sind, oder NMIBC, die als high-grade klassifiziert wurden. Sie haben häufig einen instabilen aneuploiden Karyotyp [58]. Hierbei treten häufig *loss-of-function* Mutationen in den Tumorsuppressor Genen *TP53*, *RB1* und *PTEN* auf [59]. Außerdem trifft man Mutationen im *ERCC2* Gen häufiger bei MIBC oder high-grade NMIBC, als bei PUNLMP oder Low-Grade NMIBC (pTa). *ERCC2* ist Teil des Nukleotid Exzision Reparatur Mechanismus und steuert die Antwort auf DNA-Schäden. Dennoch sind *ERCC2* Mutationen eher mit einer guten Prognose assoziiert [60]. Tumoren, die dem nicht-papillären Weg folgen, haben ein größeres Invasions-, und Rezidiv Risiko und somit eine ungünstigere Prognose [41]. In Abbildung 1 ist dargestellt, welche Gen Mutationen mit einer eher guten oder einer eher schlechten Prognose assoziiert sind. Dabei sieht man, dass Mutationen im *FGFR3* Gen mit einer besseren und Tumore mit einer Mutation im *TP53* Gen mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind.

<b>Tumortyp</b>	<b>Mittlere Überlebenszeit (m)</b>	<b>Molekulares Profil</b>
Squamös zellartig	20,6	PD1, CTLA4, M2
Neuronal	87	WNT/ $\beta$ -catenin
Mesenchymal	86,6	AXL
Luminal	91,7	KRAS, MPAK, KMT2 C/D
HER-2 assoziiert	107,7	ERCC2
Papillär	135	FGFR3

Tab. 4.: Tumortyp nach molekularem Profil und der mittleren Überlebenszeit[41].

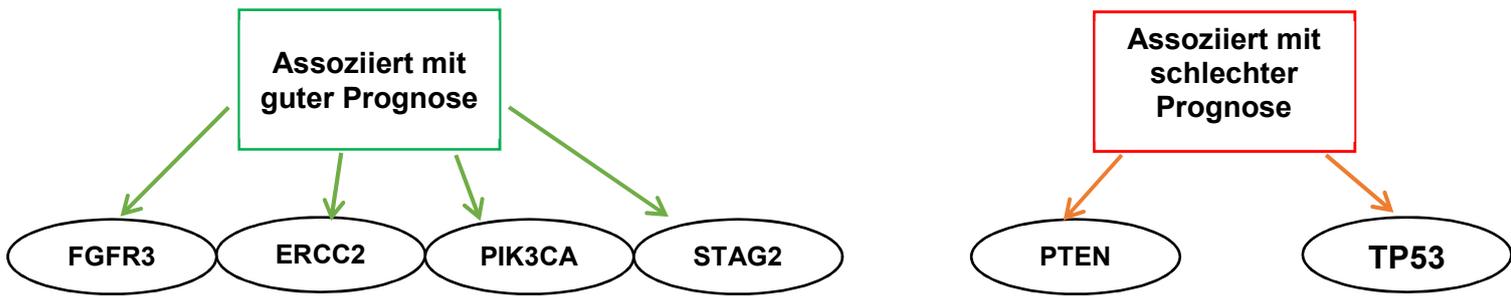


Abb.1: Assoziation der Tumormarker mit der klinischen Prognose

## 1.2 Biomarker

### 1.2.1 FGFR 3

*FGFR3* ist ein Protein, das durch das Chromosom 4q16.3 kodiert wird. Das *FGFR3* Gen produziert verschiedene Subtypen des *FGFR3* Proteins. Je nach Subtyp können *FGFR3* Proteine an verschiedenen Orten vorkommen, z. B. in Knorpelgewebe, Knochen, Darm, Gehirn, Niere, oder in den harnableitenden Organen [61]. Das *FGFR3* Protein spielt eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel, durch die Regulation der Ossifikation. Eine *Gain-of-function* Mutation des *FGFR3* Gens inhibiert die Proliferation von Chondrozyten, was zu einer Hypo-, oder Achondroplasie führt [62]. Entwicklungen im Bereich des Next Generation Sequencing (NGS) führten zur Entdeckung von *FGFR3* Mutationen in einer Vielzahl von Tumoren. Am häufigsten sind *FGFR3* Mutationen in Urothelkarzinomen zu finden (18 %), gefolgt von Uterussarkomen (14 %), Ösophagus- (5 %), Ovarial- (5 %), und Endometriumkarzinomen (4 %) [63]. Die häufigste Mutation beim Urothelkarzinom ist die Hotspot *Gain-of-function* Mutation S249C. Die Mutation wird wahrscheinlich durch eine Mutation im APOBEC Enzym hervorgerufen [64]. *FGFR3* Mutationen treten häufig bei Low-Grade NMIBC (pTa) auf und sind mit einer guten klinischen Prognose assoziiert [65]. *FGFR3* Mutationen dienen als prognostischer Marker bei Patienten mit Urothelkarzinom. Patienten, bei welchen *FGFR3* Mutation zu finden sind, können für eine *FGFR3*-gezielte Immuntherapie ausgewählt werden [66].

### 1.2.2 PIK3CA

Das *PIK3CA* Gen befindet sich auf dem Chromosom 3q26.32. Es kodiert die katalytische Untereinheit p110 $\alpha$  der Phosphoinositid-3-Kinase. Die PI3-Kinase ist für die Bildung von PIP3 aus PIP2 verantwortlich. PIP3 aktiviert weitere Enzyme, wie die Proteinkinase B (PKB), die Zellwachstum fördert, Apoptose verhindert und metabolische Reaktionen reguliert [67]. Mutationen im *PIK3CA* Gen führen zu Störungen im PI3K/AKT-Signalweg, was das Zellwachstum verändert. Somatische Mutationen im *PIK3CA* können zum PIK3CA-assoziiertes Großwuchssyndrom führen. Aktivierende *Gain-of-function* Mutationen im *PIK3CA* können zu Karzinomen in einer Reihe verschiedener Organe führen. So können in 25-40% aller Brustkarzinome *PIK3CA* Mutationen nachgewiesen werden. Außerdem finden sich *PIK3CA* Mutationen in Karzinomen des Kolons (32%), Endometriums (26%), Gehirn (27%), Haut (20%), Ovarium (4-12%), Magen (25%), Harnblase (13%) und in vielen weiteren Organen [68]. *PIK3CA* Mutationen in NMIBC sind mit einer besseren Prognose, und einem geringerem Invasions-, und Rezidiv Risiko assoziiert [56].

### 1.2.3 PTEN

Das *PTEN*-Gen liegt auf dem Chromosom 10q23-24 und kodiert das gleichnamige Protein, das die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäureester katalysiert. *PTEN* ist ein Tumorsuppressor, der den *PI3K-AKT/PKB-Signalweg* durch die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositolphosphaten unterbrechen kann [69]. *Loss-of-function* Mutationen können die Entstehung von Tumoren verschiedenster Arten begünstigen [70]. Mutationen des Tumorsuppressoren *PTEN* sind zumeist *loss-of-function* Mutationen und mit einer schlechteren Prognose des NMIBC assoziiert [59].

### 1.2.4 STAG2

Das *STAG2* Gen kodiert u. a. das Protein Kohesin-Untereinheit 2 (SA2). Das Protein SA2 ist Bestandteil des Kohesin Komplexes, welcher Schwester Chromatiden nach der DNA-Replikation zusammenhält [71]. *STAG2* Mutationen treten früh bei der Entwicklung von Urothelkarzinomen der Harnblase auf, womit

sie ein früher prognostischer Marker für die Entstehung von Urothelkarzinomen sind [57]. Außerdem wird eine Rolle von *STAG2* bei DNA-Reparatur Mechanismen vermutet. Mutationen im *STAG2* Protein, bei Urothelkarzinomen sind meist *loss-of-function* Mutationen, die die Funktion des *STAG2* Protein behindern. *STAG2* Mutationen sind häufiger in NMIBC (24-36 %), als in MIBC (10-16 %) zu finden [72].

#### 1.2.5 TP53

Das Tumorsuppressor-Gen *TP53* befindet sich auf dem Chromosom 17p13.1. Es kodiert das p53-Protein, welches u. a. an der Regulierung der DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt ist. Das p53-Protein kann den Zellzyklus unterbrechen und die Proliferation atypischer Zellen verhindern. Dadurch können DNA-Schäden repariert und ggf. die Apoptose eingeleitet werden [73]. Das p53-Protein kann in der G1-Phase intervenieren und den Zellzyklus unterbrechen, indem es die Expression des Proteins p21 indiziert. Das Protein p21 hemmt den D-Cyclin/CDK4/6- und den Cyclin E/CDK2-Komplex, beide indizieren den Übergang des G1-Stadiums in die S-Phase. Außerdem kann das p53-Protein die Zellteilung in der G2-Phase stoppen, indem es die Bildung des B-Cyclin/CDK1-Komplex, welches die Einleitung der Mitose indiziert, verhindert [74]. Mutationen des *TP53*-Gens sind häufig bei verschiedenen Tumor Entitäten zu finden. Bei einer *loss-of-function missense* Mutation des *TP53* Gens kann der Zellzyklus mithilfe des p53 Proteins nicht gestoppt werden, sodass es zu einer unkontrollierten Zellteilung von atypischen Tumorzellen kommen kann [75]. Häufig haben MIBC oder HG-PUC NMIBC eine Mutation des Tumorsuppressor Gens *TP53* [56].

#### 1.2.6 ERCC2

Das *ERCC2* Gen liegt auf dem Chromosom 19q13.32. Es kodiert das gleichnamige Protein. Das *ERCC2* Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Es ist durch die 5'-3'-Helikase-Aktivität an der Trennung der Doppelhelix beteiligt [76]. Das *ERCC2* Protein ist Teil des TFIIH-Komplexes, welcher für die Gen-Transkription und der DNA-Reparatur

verantwortlich ist. Die DNA-Reparatur erfolgt durch die Nukleotid Exzisions Reparatur. Die DNA kann durch verschiedene Faktoren geschädigt werden, wie durch chemische Stoffe oder schädigende Strahlen. Der TFIIH Komplex trennt und entwindet die DNA-Stränge, sodass beschädigte Proteine identifiziert werden können [77]. *Loss-of-Function* Mutationen des *ERCC2*-Gens sind häufig bei Karzinomen der Harnblase, meist bei MIBC oder HG-PUC, der Haut und bei Non-Hodgkin-Lymphomen zu finden [78].

### **1.3 Immunhistochemische Protein Marker**

#### **1.3.1 Mitosemarker pHH3 und Proliferationsmarker mib-1**

Das Protein Ki-67 ist an der Regulation der DNA-Replikation und des *Chromatin Remodeling* beteiligt. Eine hohe Zellproliferationsrate ist mit einer hohen Expressionsrate des Ki-67 Proteins assoziiert. Malignes Gewebe mit einer erhöhten Ki-67 Expression deutet auf eine schlechtere Prognose hin. Durch den immunhistochemischen monoklonalen Antikörper Mib-1 wird die Ki-67 Expression im untersuchten Gewebe sichtbar gemacht [79]. Neben dem Antikörper Mib-1, kann der Antikörper pHH3 verwendet werden, der als Mitosemarker bekannt ist und Mitosen anfärbt. Eine hohe Anzahl an Mitosen in malignem Gewebe ist ein Indikator für eine schlechtere Prognose [80].

#### **1.3.2 Zytokeratinmarker CK20**

Das Protein Zytokeratin 20 (CK20) gehört zur Zytokeratin-Familie und wird vom gleichnamigen Gen kodiert. Das CK20 Protein hat als Intermediärfilament die Funktion, die strukturelle Integrität des Epithels zu gewährleisten. CK20 wird von Epithelzellen verschiedener Organe exprimiert, darunter die Mukosa des Gastrointestinaltraktes, der Harnblase, und der harnableitenden Wege [81]. Selbst bei Harnblasenentzündungen ist das CK20 Protein auf die superfiziellen Umbrella Zellen des Urothels der Harnblase beschränkt [82]. Dieses Muster kann jedoch bei Vorhandensein von Malignomen verändert sein. Tumoren der Harnblase oder des Gastrointestinaltraktes können eine Überexpression von

CK20 zeigen. Diese Veränderungen können durch den immunhistochemischen Antikörper CK20 aufgedeckt werden [83].

### 1.3.3 Tumorsuppressorprotein p53

Das p53- Protein, das vom TP53 Gen kodiert wird, wird auch als „Wächter der Zelle“ bezeichnet. Durch DNA-schädigende Reize wird das Protein p53 aktiviert, es initiiert eine Unterbrechung des Zellzyklus und leitet DNA reparierende Maßnahmen ein. Mutationen, die zu einer gestörten Funktion der Proteine p21 und p53 führen, können die Entstehung von Tumoren fördern. Eine gestörte Expression von p21 oder p53 kann durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen werden [75].

### 1.3.4 Zellzyklusproteine p16 und p21

Der CDK-Inhibitor 2A (p16) ist ein Protein, das durch das CDKN2A-Gen kodiert wird. Das Protein p16 greift durch die Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen in den Zellzyklus ein. Durch die Verhinderung des Überganges in die S-Phase wird der Zellzyklus unterbrochen. Somit fungiert das p16 Protein als Tumorsuppressor Protein [84]. Mutationen im CDKN2A-Gen können zu inaktiven p16-Protein führen. Dies begünstigt die Entstehung von Tumoren, wie z. B. Melanomen, Pankreaskarzinomen, oder Harnblasenkarzinomen. Durch die immunhistochemische Färbung mit dem p16 Antikörper kann eine abnorme p16 Expression gezeigt werden [85]. Das p21 Protein, auch CDK-Inhibitor 1 genannt, wird vom CDKN1A Gen kodiert. Genauso wie das p16 Protein, kann auch das p21 Protein in den Zellzyklus eingreifen und ihn unterbrechen. Beide Proteine, sowohl p16, als auch p21 haben die Funktion als Tumorsuppressor Protein gemein. Die Unterbrechung des Zellzyklus erfolgt durch die Bindung und Inhibierung der Cyclin abhängigen Kinasen [86]. Das p21 Protein interagiert mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie u. a. das p53 Protein. Das p53 Protein aktiviert die Transkription vom p21 Protein.

## 1.4 Ziele der Arbeit

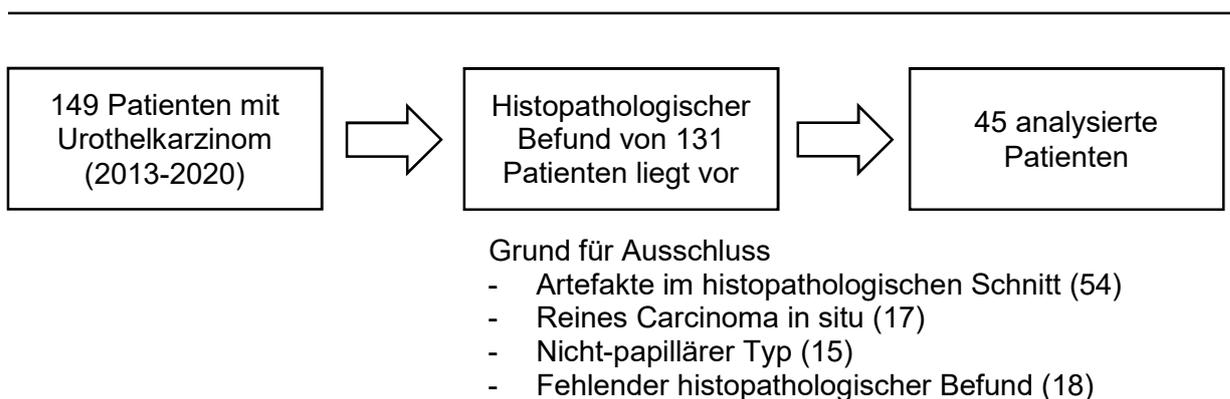
Die genaue und frühe Klassifikation von nicht-invasiven papillären Urothelkarzinomen der Harnblase ist essenziell für die Therapieentscheidung und die klinische Prognose der Patienten. Derzeit ist der Goldstandard für die Diagnose der NMIBC die histologische Klassifikation des HE-Schnitte durch den Pathologen. Für die Graduierung der Tumore wird die 2004/2016-WHO-Klassifikation genutzt, die die Tumore in PUN-LMP, LG-PUC oder HG-PUC einteilt. Dabei bilden zytologische und architekturelle Parameter des Tumors die Basis der Tumorgraduierung [20]. Jedoch werden diese Parameter meist subjektiv bewertet, da es, anders als bei der Graduierung anderer Tumorentitäten wie des Mammakarzinoms, keine festen Richtwerte für die Interpretation der Parameter gibt. Die Subjektivität bei der Interpretation von NMIBC spiegelt sich in den hohen *interobserver variabilities* wider. Besonders bei den Entitäten PUN-LMP und LG-PUC ist diese Variabilität relativ hoch [47]. Es gibt verschiedene Ansätze für eine verbesserte Klassifikation von NMIBC. Dazu gehören die Analyse der Expression verschiedener Proteine sowie die Untersuchung von Mutationen bestimmter Gene und deren Korrelation mit den Tumorgraden. Eine Progression von PUN-LMP oder LG-PUC zu HG-PUC oder MIBC ist zu beobachten, wobei das Invasions-, und Rezurrenzzisiko bei HG-PUC deutlich erhöht ist.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine verbesserte Graduierung und Diagnose der papillären urothelialen NMIBC zu erreichen. Dies soll durch eine multiparametrische Klassifikation erreicht werden, die histologische, immunhistochemische und genetischen Parameter umfasst. Durch die verbesserte Klassifikation der Tumore erhofft man sich eine frühere, genauere Diagnose des Tumors, um eine Progression zu verhindern und die passende Therapie einleiten zu können. Dadurch soll die Prognose und der klinische Verlauf der Patienten verbessert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkohorte

Es wurden retrospektiv HE-Schnitte von 149 Patienten identifiziert, die zwischen 2013 und 2020 wegen einem Urothelkarzinom der Harnblase am Universitätsklinikum Tübingen behandelt wurden und deren histologische Präparate am Institut für Pathologie der Universität Tübingen untersucht worden sind. Insgesamt wurden die histologischen Schnitte von 104 Patienten ausgeschlossen. Ausschlusskriterien waren zu viele Artefakte im histopathologischen Schnitt ( $n = 54$ ), reines Carcinoma in situ ( $n = 17$ ), nicht-papillärer Typ ( $n = 15$ ), fehlender histopathologischer Befund ( $n = 18$ ). Insgesamt wurden die Schnitte von 45 Patienten in die Studie eingeschlossen. Folgende Parameter wurden nach Durchsicht der Pathologiebefunde und mithilfe des klinikinternen Dokumentationsprogramms erhoben und dokumentiert: Geschlecht, Alter, T-Stadium, N-Stadium, M-Status, Lokalisation des Tumors innerhalb der Harnblase, Rekurrenz, Therapie und histologisches Grading. Bei einem der 45 Patienten lagen keine klinischen Daten vor.



*Abb. 2: Kohortendiagramm: Darstellung der analysierten Kohorte mit ein- und ausgeschlossenen Patienten*

## 2.2 Histologische Klassifikation

Zunächst erfolgte die uropathologische Diagnostik der Schnitte durch das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Tübingen. Für die histopathologische Diagnostik wurden 3 µm dicke, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Tumorproben untersucht. Dabei wurden die Schnitte von 3 verschiedenen Pathologen unabhängig voneinander untersucht und anhand der Kriterien des WHO-Klassifikationssystems 2004/2016 [29] als PUNLMP, Low-Grade oder High-Grade klassifiziert. Dabei wurde ein Mikroskop von der Marke *Zeiss Axioskop* benutzt. Die Klassifikation der Schnitte erfolgte verblindet und unabhängig voneinander. Die Beurteilung erfolgte bei niedriger, mittlerer und hoher Vergrößerung (100x, 200x and 400x). Dabei wurden die Parameter des Klassifikationssystems von 2004/2016 als Grundlage für die Klassifikation genommen. Dazu gehörten die architekturelle und zytologische Struktur. Die Architektur umfasst die papilläre Struktur, dabei wird darauf geachtet ob die Papillen schmal, verschmolzen, oder solide sind, sowie auf die Form und Dicke der Urothelschichten. Dabei ist die Dicke des Urothels stärker zu berücksichtigen als die papilläre Struktur bei der Klassifikation der Schnitte. Zu der Zytologie gehören die Anzahl und Lokalisation der Mitosen, die Dichte und Verteilung des Chromatins, die Unterschiede in Form und Größe des Nukleus, die Kern-Plasma Ratio und die Präsenz des Nukleolus. Besonders wichtig bei der Beurteilung der Zytologie waren die Beurteilung der Mitosen und des Chromatins. Histologische Schnitte mit schlanken, nicht verschmolzene Papillen und normalem Urothel mit minimalen atypischen zytologischen Parametern, wurden als PUNLMP klassifiziert. Low-Grade-Urothelkarzinome wurden diagnostiziert, wenn die Papillen nicht verschmolzen und mild atypische zytologische Parameter vorhanden waren, z. B. Mitosen in der unteren Hälfte des Urothels. High-Grade-Fälle zeigten bei geringer Vergrößerung unorganisierte architekturelle Strukturen sowie moderat bis stark ausgeprägte zytologische Atypien, z. B. Mitosen über das ganze Urothel hinweg verteilt [29].

## 2.3 Klinische Daten

Mithilfe des internen Systems des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen konnten die histopathologischen Daten zu den einzelnen Patienten erhoben werden. Diese Daten umfassen die Erstdiagnose, die Klassifikation nach dem WHO-Schema von 2004 und 2016, die Fokalität, so wie die genaue Lokalisation des Tumors innerhalb der Harnblase. Die klinischen Daten der Patienten wurden uns von der Urologischen Klinik des Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellt. Dabei wurden uns folgende Daten zu den Patienten übermittelt: Datum der letzten Zytoskopie, Anzahl, Datum und Grading der Rezidive, Therapieverlauf, sowie letzter Kontakt mit dem Patienten. Für die Rezidivfreie Überlebenszeit wurde der Zeitraum fünf Jahre nach dem Tag der Erstdiagnose oder der Zeitraum zwischen dem letzten Follow-Up und dem Tag der Erstdiagnose berücksichtigt.

## 2.4 Immunhistochemie

Ziel der Immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten ist der Nachweis der Expression spezifischer Proteine. Mithilfe immunhistochemischer Verfahren können Struktur, Organisation, Entwicklung und Differenzierung von tumorösem Gewebe dargestellt werden. Dabei werden bestimmte Antikörper verwendet, die mit den zu untersuchenden Antigenen binden. Dabei können die spezifischen Interaktionen veranschaulicht und lokalisiert werden. Antigen-Antikörper Interaktionen weisen eine hohe Spezifität auf, weshalb immunhistochemische Techniken in der Regel präziser sind als histochemische. Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper führt zur Bildung von Immunkomplexen, die als Präzipitate dargestellt werden können. Bei den immunhistochemischen Färbungen werden meist Antikörper vom IgG-Typ benutzt, welche schwere Ketten vom Typ Gamma  $\gamma$  und zwei leichte Ketten vom Typ Kappa  $\kappa$  und Typ Lambda  $\lambda$ . Das Fab-Fragment, welches von den Leicht-, und Schwereketten gebildet wird, trägt die Antigenerkennungsregion, die für die spezifische

Antigenbindung verantwortlich ist. Antikörper werden an fluoreszierende oder enzymatische Markierungen konjugiert, deren starke Signale eine Visualisierung ermöglichen, wenn Schnitte unter einem Mikroskop analysiert werden. Ein Vorteil der enzymatischen Markierung von sekundären Antikörpern wie Meerrettich-Peroxidase (Meerrettich-HRP) besteht darin, dass übliche Durchlichtmikroskopie und chemische Gegenfärbungen, wie Kerne mit Hämatoxylin, die morphologische Darstellung unterstützen können. Die geringe Größe der Peroxidase ist auch vorteilhaft, damit sie die Bindung von Antikörpern an benachbarte Stellen nicht behindert. Es wird in hochgereinigter Form geliefert, um das Risiko einer Kontamination und unspezifischer Farbreaktionen zu verringern. Es ist stabil und bleibt während der Herstellung, Lagerung und Verwendung im Wesentlichen unverändert. Während der Untersuchung werden positive und negative Kontrollen genutzt. Die Positiv-Kontrolle ist eine bekannte, identisch vorbehandelte Probe, die das gesuchte Antigen enthält. Sie zeigt die Sensitivität der Methode v. a. im unteren positiven Bereich. Die Negativ-Kontrolle ist eine bekannte, identisch vorbehandelte Probe, die das gesuchte Antigen nicht enthält. Als Leerpräparat dienen unbekannte Proben, welche nur mit Verdünnungspuffer oder nicht-bindenden Kontrollantikörpern bzw. nur mit dem Sekundärantikörper bearbeitet werden. Dies dient zur Unterscheidung zwischen positiven Ergebnissen von unspezifischen Proteinbindungen, endogenen Peroxidaseaktivitäten oder anderen unerwünschten Reaktionen.

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein automatisierter Färber von der Marke „*Ventana Medical Systems*“, *Tucson, AZ, USA* genutzt. Dabei verlief die Färbung nach dem Protokoll des Herstellers. Die Schnitte wurden mit folgenden Antikörpern gefärbt: *CK 20* ((M7019, *Dako Dako Cytomation, Glostrup, Denmark*), *p16* (06594441001, *CINtech, Roche, Mannheim Germany*), *p21* (556431, *BD Pharmigen, San Jose, California, United States*), *p53* (DO-7, *Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany*), *MIB-1* (M7240, *Dako Cytomation, Glostrup, Denmark*), *p-HH3* (117C826, *IMGENEX, San Diego, USA*) und *FGFR3* (*sc-13121, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany*).

Bei der Interpretation der immunhistochemischen Schnitte wurden Intensität und Anteil des gefärbten Gewebes berücksichtigt. Dabei werden der Vergleich zwischen unspezifischen und spezifischen Reaktionen, sowie Farbintensitäten unbekannter Proben und Kontrollen interpretiert. Die Farbintensität des untersuchten Gewebes setzt sich aus der Menge des präzipitierten Chromogens zusammen, welches proportional zur Menge des Antigens ist. Außerdem unterscheidet man die Färbung von zytoplasmatischen und nukleären Anteilen des Gewebes. Spezifische Reaktionen sind auf Zellen beschränkt, wobei unspezifische Färbungen vor allem die Bindegewebsmatrix betreffen. Bei der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte, gibt es mehrere Quellen, die Interpretationsfehler zulassen. So können unspezifische Farbstoff-Präzipitate mit der Färbung von spezifischem Antigen verwechselt werden und fließen in die Wertung mit ein. Eine weitere mögliche Fehlerquelle sind Gewebsartefakte. Diese können beim Schneiden der Schnitte entstehen, welche zu Zellartefakte führen, wie nekrotische, zerquetschte oder hämorrhagische Zellen. Diese Zellartefakte können positiv gefärbt werden und müssen von spezifischen Antigenfärbungen unterschieden werden. Außerdem sollten Hintergrundfärbungen beachtet werden. Dabei liegt das gesuchte Antigen in hoher Konzentration im Serum vor, sodass es zu einer intensiven Hintergrundfärbung kommt, welche das Antigen in den Zellen verdecken kann. Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte nach dem *Histoscore*. Dieser setzt sich zusammen aus der Intensität der Färbung und dem Anteil des gefärbten Gewebes. Die Intensität der Färbung wurde an der Membran und dem Zytoplasma beurteilt, und durch die verschiedenen Intensitäten kategorisiert. Dabei waren 0: negativ, +: schwach, ++: moderat und +++: stark. Der Anteil des gefärbten Gewebes wurde in Prozent angegeben. Die beiden Parameter wurden miteinander verrechnet. Die Intensität 0 wurde als Faktor 0, + als Faktor 1, ++ als Faktor 2 und +++ als Faktor 3 verrechnet. Der entsprechende Faktor des Schnittes wurde mit dem Anteil des gefärbten Gewebes multipliziert. Somit ergaben sich mögliche Werte für den *Histoscore* im Bereich von 0 bis 300. Lediglich der Antikörper p-HH3 wurde anders beurteilt. Für den Antikörper pHH3 erfolgte eine alternative Bewertung, bei der Mitosen in einem Bereich von 2 mm<sup>2</sup>

(etwa 10 „High-power fields“, HPF) gezählt wurden. Die Mitosen wurden im Bereich des entarteten Urothels gezählt. Für die Immunhistochemische Beurteilung wurde ein *Zeiss Axioskop* Mikroskop benutzt.

## 2.5 Next Generation Sequencing

### 2.5.1 DNA Extraktion

Für die Sequenzierung der zu untersuchenden Gene, erfolgt zunächst die Extraktion der DNA, welche im Verlauf sequenziert wird. Die DNA Extraktion erfolgte aus dem verbleibendem Biopsie Tumorgewebe. Dabei wurde das *Maxwell® RSC DNA FFPE Kit* und das *Maxwell® RSC Instrument (Promega, Madison, WI, USA)* benutzt. Das makrodissezierte Gewebe lag in 180µl Inkubationspuffer vor. Der erste Schritt war die Zell Lyse mit Proteinkinase K Verdau. Dabei wurde aus dem Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) jeweils 20µl Proteinkinase K hinzugegeben. Danach wurden die Proben bei 70°C auf dem Schüttler bei geschlossenem Deckel über die Nacht inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden 2 V Lyse Puffer zu den Proben gegeben. Anschließend wurden die die Proben kurz gevortext. Zunächst wurde das Instrument *Maxwell 16 FFPE plus LEV DNA Purification* mit *DNA Exitus plus* gereinigt. Daraufhin wurden die Kartuschen, *LEV/RSC Plungers* und *Elutiontubes* in das *Maxwell 16 LEV/RSC Cartridge Rack* gestellt. Dabei hat man zwischen den Proben jeweils 2 Plätze freigehalten. Außerdem wurde je ein *LEV/RSC Plunger* in das 8. Well jeder Kartusche platziert. Es wurde 60-100µl Nuklease-freies Wasser in die Elutions Röhren gegeben und die Probe in das 1. Well der Kartusche überführt. Nachdem das *Maxwell 16 Instrument* vorbereitet wurde, hat man das *Maxwell RSC* Gerät gestartet. Dabei wurde das Gerät hochgefahren und das Programm „*cell DNA*“ für die DNA-Isolation ausgewählt und bestätigt. Das *Maxwell 16 Instrument* wurde ins Gerät gestellt und das Programm lief für etwa 24 Minuten. Daraufhin wurde das *Maxwell 16 Instrument*, nachdem man die Kartuschen entsorgt hat, wieder in das Gerät gestellt und für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Danach wurden die Elutions Röhren kurz

zentrifugiert und auf die Magnetplatte gestellt, um die *Beads* zu entfernen und die isolierte DNA in 1,5ml-Behälter überführt.

### 2.5.2 DNA Quantifizierung

Nach der DNA-Extraktion erfolgte eine Quantifizierung der DNA-Konzentration, um sicherzustellen, dass ausreichendes Material für die Sequenzierung vorliegt. Für die Quantifizierung der DNA besteht die Möglichkeit einer UV/VIS-Spektroskopie oder einer Fluoreszenzspektroskopie. Wir benutzten für die Quantifizierung der DNA die Fluoreszenzspektroskopie, bei welcher die Licht-Emissionen, die sogenannte „Fluoreszenz“ des zu untersuchenden Materials für die Bestimmung der Konzentration genutzt werden. Für die Messung der DNA-Konzentration benutzt man den *Qubit Fluorometer*. Dabei musste man zunächst die *Qubit dsDNA HS reagent* lichtgeschützt auftauen. Für das Ansetzen der Arbeitslösung hat man die *Qubit dsDNA HS reagent* 1:200 im *Qubit dsDNA HS Puffer* verdünnt. Dabei wurde für jede Probe 199 µl Puffer und 1 µl Reagenz verwendet. Diese Mischung wurde kurz vortexiert und zentrifugiert. Die Arbeitslösung benutzte man für den Standard, indem man zu 190 µl Arbeitslösung, 10 µl von Standard 1 bzw. 2 hinzu pipettiert. Für die Proben wurde zu 199 µl der Arbeitslösung je 1 µl Probe hinzu pipettiert. Sowohl die Proben, als auch die Standards wurden für 2-3 Sekunden vortexiert und zentrifugiert. Danach wurde das *Qubit Fluorometer Programm* eingeschaltet und zunächst die Tuben für die Standards 1 und 2 in den *Fluorometer* gestellt, der Deckel geschlossen und auf „Read“ gedrückt, um die Kalibrierung zu beenden. Nach der Kalibrierung wurden die Proben mit jeweils 1 µl in den Fluorometer gestellt und die DNA Konzentration (ng/µl) gemessen.

### 2.5.3 Amplifizierung

Als nächster Schritt folgte die Amplifikation der DNA. Ziel ist die Vermehrung der zu untersuchenden DNA-Abschnitten, für ein besseres Ergebnis der Gen Sequenzierung. Bei der Durchführung der PCR ist grundsätzlich auf eine strikte Raumtrennung zu achten. Dabei muss die Zugabe der DNA nach der Herstellung des PCR Mix von dieser räumlich separat erfolgen. Alle Materialien müssen möglichst DNA-frei sein (Desinfektion der Arbeitsflächen mit *DNA-ExitusPlus*).

Die isolierten DNA-Proben müssen eine Zielkonzentration von 5ng/µl haben. Dafür muss eine Verdünnung mit Wasser nach folgender Formel angesetzt werden:  $DNA\text{-Konz. (ng/\mu l)} * 2 / 5^{-2} = H_2O (\mu l)$ . In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung der Lösung Ansatzes für die DNA-Amplifizierung beschrieben.

Reagenz	Volumen Ansatz (µl)	1. Lauf (µl)	2. Lauf (µl)	3. Lauf (µl)
ddH <sub>2</sub> O	16,8	195,0	70,2	195,0
10*Puffer II (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5	62,5	22,5	62,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,0	50,0	18,0	50,0
dNTPs (10mM)	0,5	12,5	4,5	12,5
Primer Mix	2,0	50,0	18,0	50,0
Ampli Taq Gold DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2	5,0	1,8	5,0
Gesamt Volumen	15,0	375,0	135,0	375,0

Tab. 5: Volumen der Lösungen für den Ansatz der DNA-Amplifizierung (in µl)

#### 2.5.4 Gelelektrophorese

Allgemein wird bei der Gelelektrophorese ein elektrisches Feld benutzt, um eine Mischung zu trennen und eine entsprechende Messung durchzuführen, in unserem Fall die Messung der Basenpaarlänge. Für die Durchführung der Gelelektrophorese ist zunächst die Herstellung von Agarosegel notwendig. Um zwei-%-iges Agarosegel zu gießen, benötigt man in einem separaten Erlenmeyerkolben TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) und *LE-Agarose*. Zunächst wurde 2 g *LE-Agarose* im Erlenmeyerkolben abgewogen und auf 100 ml mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt. Dieses wurde für zwei bis vier Minuten in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Aufkochen wurde das Gemisch im Magnetrührer für 3 Minuten platziert und abgekühlt. Dabei wurden 7 µl eines Nukleinsäuren-Gel Färbemittel, das sogenannte *GelRed* dazugegeben und geschwenkt. Zuletzt musste das Gel unter Abzug für 30 Minuten aushärten. Für die Gelelektrophorese wurde das zuvor hergestellte, zurechtgeschnittene, Gel in einen Behälter gelegt, welcher an Strom angeschlossen war, und mit Puffer

bedeckt. In die erste Tasche wurde 10 µl 100 bp eines DNA Leiters pipettiert. Daraufhin wurden für jeden Ansatz jeweils 2 µl eines DNA Färbemarkers auf Parafilm vorgelegt. Diese wurden mit 10 µl des PCR-Produktes gemischt und in die Tasche übernommen. Nachdem für jede Probe, das entsprechende PCR-Produkt in die Taschen pipettiert wurde, lief die Gelelektrophorese bei 160 Volt für 30 Minuten. Nachdem die Gelelektrophorese für 30 Minuten lief, wurde der Computer mit der Software „*BioCapt*“ hochgefahren. Das Gel wurde auf dem UV-Schirm platziert und das Bild mit der Kamera scharf gestellt. Sobald das Bild scharf gestellt wurde, wurde ein Foto geschossen und gespeichert. Anhand des Bildes konnte nun die Basenpaarlänge der einzelnen Proben erkannt werden.

#### 2.5.5 Targeted Next Generation Sequencing

Die Targeted NGS (Next Generation Sequencing, NGS) ist ein Sequenzierungsansatz, der, statt das gesamte Genom zu sequenzieren, sich auf bestimmte Regionen des Genoms konzentriert. Dieser gezielte Ansatz kann die Sequenzierungseffizienz verbessern, die Sequenzierungskosten senken und die Empfindlichkeit für den Nachweis genetischer Variationen in bestimmten Regionen von Interesse erhöhen. Bei der gezielten NGS wird in der Regel eine Capture- oder Amplikon-Methode verwendet. Bei der Capture-basierten Sequenzierung werden gewünschte DNA-Fragmente mit Hilfe von Sonden oder Ködern eingefangen, die so konzipiert sind, dass sie an bestimmte genomische Regionen hybridisieren. Wir verwendeten die sogenannte Amplikon basierte Sequenzierung, bei der spezifische Genomregionen mittels PCR amplifiziert und die resultierenden Amplikons anschließend sequenziert werden. Ein Vorteil der gezielten NGS ist die Möglichkeit, sich auf bestimmte Regionen von Interesse zu konzentrieren, z. B. auf Gene, von denen bekannt ist, dass sie mit Krankheiten in Verbindung stehen, oder auf Regionen, von denen bekannt ist, dass sie genetische Variationen von Interesse enthalten. Dies kann die Empfindlichkeit und Spezifität der Sequenzierungsdaten erhöhen und den Umfang der erforderlichen Sequenzierung verringern [87].

### 2.5.6 Libraryerstellung AmpliSeq Panel:

Beim *targeted NGS*, nach der Amplikonmethode, muss die zu untersuchende Region des Gens zunächst amplifiziert und die Libraries erstellt werden. Die Vorbereitung der Amplikon Libraries erfolgte mithilfe des *Ion AmpliSeq Library Kit v2.0*, des *Ion Library TaqMan Quantitation Kit*, des *Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit – Chef* und mithilfe des *Ion 520 Chip Kit (Thermo Fisher Scientific)*. Zunächst wurde das Arbeitsmaterial zur Dekontamination für 30 Minuten unter UV-Licht bestrahlt. Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion, PCR) Reagenzien durften nicht bestrahlt werden. Danach wurde ein PCR-Gemisch hergestellt. In Tab. 6 sieht man die Volumina der einzelnen Bestandteile des PCR Gemisches. Dabei wurde eine Primer Lösung und ein HiFi Gemisch, mit der DNA Lösung vermennt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

<b>Primer Pools</b>	
	<b>Volumen Ansatz (µl)</b>
Ion AmpliSeq HiFi Mix	4
Ion AmpliSeq Primer	10
DNA 10ng	≤6
ddH <sub>2</sub> O	<b>auf 20</b>

Tab. 6: Volumen der Lösungen für den Ansatz des PCR-Mix, ddH<sub>2</sub>O: destilliertes Wasser.

Die Proben wurden vortexiert und zentrifugiert. Danach erfolgte die Amplifikation im *Thermocycler*. Dabei wurde das Programm „*Ampliseq*“ ausgewählt. Beim enzymatischen Primerverdau an den Amplikons, wurden den zuvor hergestellten Proben jeweils 2 µl FuPa (Fragmentase Universal Primer Assay, FuPa) Reagenz hinzugefügt, welches für die Teilverdauung und Phosphorylierung der Amplikons zuständig ist. Das Pipettieren erfolgte dabei auf Eis. So kam man auf ein Endvolumen von 22 µl (20 µl Probe + 2 µl FuPa Reagenz). Der Verdau erfolgte im *Thermocycler*. Dabei wurde das Program „*FuPa\_digset*“ ausgewählt. Der *Thermocycler* ist für bestimmte Temperaturwechsel der PCR zuständig (Tab. 7)

Temperatur °C	Zeit (min)
50	10
55	10
60	20
10	60

Tab. 7: Temperatur und entsprechende Laufzeit des Thermocyclers während des enzymatischen Primerverdaus.

Bei der Adapterligation wurde zunächst ein Ansatz für das Barcoding des genetischen Materials hergestellt. Dies dient zur Spezifizierung der Proben. Dabei mussten zunächst Wasser und Eppendorf-Cups unter UV bestrahlt werden sowie Wasser und Reagenzien auf Eis aufgetaut. Für das Barcode Gemisch wurde jeweils 2 µl des Barcodes und des Adapters mit 4 µl Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8 µl aufgefüllt. Als nächsten Schritt wurde zunächst die *Switch Solution* auf Eis aufgetaut. Vor Gebrauch musste man die *Switch Solution*, sowie die Barcode Gemische vortexieren und zentrifugieren. Außerdem musste man die zu verwendende DNA-Ligase kurz zentrifugieren, jedoch nicht vortexieren. Für die Reagenzien wurden jeweils 2 µl DNA Ligase und *Barcodemix* zusammen mit 4 µl der *switch solution* und 22 µl der verdauten Amplikons zu einem Gesamtvolumen von jeweils 30 µl angesetzt. Dieses Gemisch wurde im Eppendorf Thermocycler unter dem Programm „Ligation\_rkt“ ligiert.

#### 2.5.7 High Prep – Aufreinigung

Die sogenannte *High Prep-Aufreinigung*, auch *High level purification* genannt, ist ein wichtiger Schritt, welcher vor der Probensequenzierung durchgeführt wird. Bei der *High level purification* werden die Proben von Unreinheiten gereinigt, dazu gehören u. a. Salze oder Proteine. Die *High level purification* besteht aus mehreren Schritten: Vorbereitung, Extraktion und die Reinigung der Proben. Bei der Vorbereitung der Proben werden diese homogenisiert und lysiert um die DNA, bzw. RNA zu befreien. Bei der Extraktion wird das genetische Material isoliert und bei der Reinigung die Proben, mithilfe der magnetischen Beads basierten Methode, von Unreinheiten befreit. Bei der High-Prep Aufreinigung wurde 30 µl der Library Lösung zusammen mit 54 µl HighPrep Beads in bestrahlte 0,2 µl PCR-Röhren gegeben, fünfmal vorsichtig mit der Pipette gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Rohre wurden

für zwei Minuten in eine Magnetplatte der Marke „LifeTechnologies“ gestellt und der Überstand nach Verstreichen der zwei Minuten vorsichtig abgenommen. Danach wurden 200 µl frisch angesetzter 80 % Ethanol zur Reinigung der Proben hinzugegeben und die Position der Rohre geändert. Nach 30 Sekunden wurde der Überstand entfernt und der Waschvorgang wiederholt. Danach wurde das Ethanol vollständig entfernt. Nach fünf Minuten wurde 30 µl TE-Puffer, welcher aus EDTA und TRIS besteht und als Lagerlösung für das genetische Material nach der Aufreinigung dient, zu den *Beads* pipettiert und bei Raumtemperatur für zwei Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Rohre wieder in den Magnet gestellt und 30 µl der gereinigten Libraries abgenommen und in neue PCR-Rohre gegeben. Die gesamte Aufreinigung wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden 54 µl *Amp-Beads* hinzugegeben und die *Beads* zum zweiten Mal in 35 µl TE-Puffer eluiert, Fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für zwei Minuten im Magnetänder ruhen gelassen. 30 µl des Überstandes wurden entnommen und in sterile PCR-Rohre überführt.

#### 2.5.8 Quantifizierung der Libraries:

Ein wichtiger Schritt der NGS-Analyse ist die qPCR. Diese umfasst die Konzentrationsermittlung und -berechnung der Libraries am *LightCycler*. Bei der qPCR handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren zur quantitativen DNA-Messung in einer bestimmten Probe. Die qPCR ist ein sensitives und präzises Verfahren zur Messung bereits kleinerer Mengen an DNA-Konzentration. Allgemein umfasst die qPCR den Prozess der Amplifizierung der zu untersuchenden DNA mithilfe eines Primers und Polymerase Enzyme und der Messung der DNA durch den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffs oder Probe in das Amplifikationsprodukt [88, 89]. Zunächst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und der *Ion TaqMan Assay* lichtgeschützt aufgetaut. Parallel dazu wurde die E-coli (Stammlösung = 68pM) Verdünnungsreihe hergestellt:

- 
- 1 (6,8pM-Verdünnung): 22,5µl ddH<sub>2</sub>O + 2,5µl 68pM E-coli
  - 2 (0,68pM-Verdünnung): 2,5µl der 6,8pM E-Coli Verdünnung + 22,5µl ddH<sub>2</sub>O
  - 3 (0,068pM-Verdünnung): 2,5µl der 0,68pM E-Coli Verdünnung + 22,5µl ddH<sub>2</sub>O
- 

*Tab. 10: Ansätze der E. Coli Verdünnungsreihen*

Für jede Library wurde eine 1:500 Verdünnung hergestellt (2 µl Library + 998 µl ddH<sub>2</sub>O). Als nächster Schritt erfolgt das Pipettieren der Mikropipettierplatte. Dabei wurde je Pipettierplatz 5,0 µl Taqman MasterMix und 0,5 µl TaqMan Assay hinein pipettiert. Zu der 5,5 µl Mischung wurde 4,5 µl, entweder von der Library (1:500), der E-Coli Verdünnung (6,8 pM, 0,68pM, 0,0068pM), oder ddH<sub>2</sub>O als Negativkontrolle hinzugegeben. Damit ergibt sich, je Pipettierplatz ein Endvolumen von 10µl. Sobald die Proben in die Platte pipettiert wurden, wurde eine Folie über diese gelegt, die Platte herunterzentrifugiert, und in ein PCR-System, den sogenannten „Lightcycler“ eingesetzt. Das Programm „Library qPCR“ am Lightcycler wurde ausgewählt, bei welchem die Proben verschiedene Temperaturen für eine bestimmte Zeit ausgesetzt waren. Zunächst für 180 Sekunden unter 50°C, anschließend für 3 Sekunden bei 95°C und zuletzt bei 60°C für 30 Sekunden. Dieser Zyklus wiederholte sich 40 mal. Am Ende des Laufes wurden Kurven für die E-coli Standardreihe, für die Libraries und für die Negativproben angelegt. Lag die Konzentration der Proben oberhalb der, der E.coli Standardreihe, dann musste eine höhere Verdünnung erstellt werden und die qPCR wiederholt werden. Bei Werten die stark unterhalb des Standardbereichs lagen, musste die qPCR für die betroffenen Libraries wiederholt werden. Als nächstes wurden die Libraries gepoolt, bevor die Mutationsanalyse durchgeführt wurde.

#### 2.5.9 Mutationsanalyse

Die sequenzierten Proben wurden mithilfe dem *Ion Torrent Suite* und der *Ion Reporter Software (Thermo Fisher Scientific)* analysiert. Beim Lauf der Analyse wurde der *PGM-/S5-L* auf das entsprechende Barcodeset ausgewählt. Die Dateien der analysierten Proben konnten als BAM-, BAI-, und UBAM-Dateien

beim Ion Torrent Suite heruntergeladen werden. Die Analyse der Dateien liefen auf dem Ion Reporter Server. Dabei wurden die BAM Dateien hochgeladen und die Analyse nach dem Protokoll des Herstellers gestartet. Nach der Analyse wurden die Fälle in den *IGV* reingeladen. Im *IGV* können die Mutationen im sequenzierten Gen abgelesen werden. Bei der Analyse wurde auf mehrere Faktoren geachtet. Dabei wurde auf die *Mean Depth*, die *Coverage* und auf die Amplikons unter 50-, sowie unter 100 *reads* geachtet. Außerdem wurde die „*Variant allele frequency*“ (VAF) bestimmt, bei der ein Cut-off-Wert von 3 % festgesetzt wurde. Die VAF wird in Prozent angegeben und wird aus dem Anteil des variant allele von der Anzahl aller Reads für das untersuchte Gen angegeben. Unter der *Mean Depth* versteht man die durchschnittliche Anzahl an Basen, die in einer bestimmten Zeit analysiert wurde. Die *Mean Depth* ist ein wichtiger Parameter im Rahmen der NGS-Analyse. Sie gibt die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Analyse an. Die Lokalisation der Mutation wird auf cDNA und Proteinebene angegeben. Für die Interpretation der Mutation wurde diese in verschiedenen Datenbanken nachgeschlagen. Die Datenbanken waren „*ClinVar*“, „*OncoKB*“, „*Varsome*“, „*CADD*“, „*Polyphen 2*“ und „*SIFT*“. Mithilfe aller Daten konnte eine *Hit-Map* erstellt werden, welche einen Überblick der Mutationen gibt.

## 2.6 Statistische Auswertung

### 2.6.1 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der „*R-Software Version 4.0, SPSS Statistics 28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)*“ durchgeführt. Kategoriale Variablen wurden mit Häufigkeiten und Anteilen beschrieben; numerische Variablen wurden je nach Verteilung der Daten, entweder als Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) oder Median und Interquartilsbereich (IQR) angegeben. Die Normalität der Verteilung wurde durch die Untersuchung von Kurtosis, Schiefe und Q-Q-Plots bewertet. Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test bewertet. Der Chi-Quadrat Test umfasst eine Gruppe von Hypothesentests. Hierbei wurde der sogenannte Chi-Quadrat-Verteilungstest angewendet, bei welchem geprüft wird, ob die Variablen auf einer bestimmten Weise verteilt sind. Fleiss' Kappa-Tests

wurden zur Messung der Interobserver-Variabilität durchgeführt. Unter der Interobserver-Variabilität versteht man die Übereinstimmung der Untersucher bzgl. der histologischen 2004/2016-WHO-Klassifikation. Um diesen zu bestimmen, nutzt man den Fleiss' Kappa-Test, welcher die Rate an Übereinstimmung zwischen mehreren Untersuchern bestimmt. Er ist eine Erweiterung des Cohen's Kappa-Test bei welchem die Übereinstimmung von nur zwei Untersuchern bestimmt wird. Beim Fleiss' Kappa-Test können Werte zwischen 0 und 1 vorkommen. Je höher der Fleiss' Kappa Index ist, desto höher ist die Übereinstimmung der Untersucher. Für die Korrelation zwischen den Histoscores der verschiedenen Proteinexpressionen untereinander, welche bei der Immunhistochemischen Beurteilung beurteilt wurden, wurde der Spearman-Korrelation Index genutzt. Bei der Spearman-Korrelation werden zwei Variablen auf Ihre Korrelation miteinander untersucht. Dabei gibt es Werte zwischen -1 bis 1, wobei -1 für eine vollständige negative- und +1 für eine vollständige positive Korrelation steht. Die Formel für die Spearman-Korrelation ist folgende:  $\rho = 1 - \frac{6\sum d^2}{n(n^2 - 1)}$ . Die Kaplan-Meier-Analyse und der Log-Rank-Test wurden verwendet, um das Rezidiv freie Überleben für die Graduierung oder die definierten Cluster zu vergleichen. Alle statistischen Tests waren zweiseitig, und  $p < 0,05$  wurde als Hinweis auf statistische Signifikanz betrachtet.

### 2.6.2 Cluster Analyse

Es wurde eine Clusteranalyse durchgeführt, um Gruppen von Patienten mit gemeinsamen Parametern zu identifizieren. Ziel dabei war es die Verteilung der Gruppen in den Clustern zu analysieren. Dabei wurde untersucht, ob es eine zu der 2004/2016-WHO-Klassifikation kongruente Verteilung der Fälle in den Clustern gibt. Da die Fälle nach gemeinsamen Parametern in verschiedene Clustern gruppiert wurden, wollten wir herausfinden, ob dies der 2004/2016-WHO-Klassifikationen der Tumoren entspricht. Die Analyse wurde nur für 37 Fälle durchgeführt, da bei acht Patienten die Daten fehlten. Es wurde eine Standardisierung der Variablen durchgeführt, um einen Mittelwert von Null und eine Standardabweichung von Eins zu erhalten. Die Clustering-Analyse basierte auf den folgenden Variablen: 2004/2016-WHO-Klassifikation der HE-Schnitte (PUNLMP, LG-PUC und HG-PUC), Immunhistochemie (CK20, p53, MIB-1, p16,

p21, *FGFR3* und p-HH-3) und Mutationsstatus von *ERCC2*, *FGFR3*, *PIK3CA*, *PTEN*, *STAG2*, *TP53* (mutiert vs. nicht mutiert). Der „*Partitioning around Medoids*“ (PAM) Algorithmus des K-Medoids-Clusters wurde verwendet, um die Patienten auf Grundlage ähnlicher Variablen zu gruppieren, da dieser Algorithmus weniger empfindlich auf Ausreißer reagiert. Bei dieser Methode wird jedes Cluster durch einen der Datenpunkte im Cluster repräsentiert. Diese Punkte werden Cluster Mittel genannt (Objekt innerhalb eines Clusters, für welches die durchschnittliche Unähnlichkeit zwischen ihm und allen anderen Mitgliedern des Clusters minimal ist). Die Berechnung des Abstands zwischen zwei reell wertigen Vektoren wurde mit Hilfe des Euklidischen Abstands durchgeführt, der wie folgt definiert ist:  $deuc(x, y) = \sqrt{\sum (x_i - y_i)^2}$ . Die Silhouetten Methode wurde angewandt, um die optimale Anzahl von Clustern zu schätzen.

## 2.7 Materialliste

### 2.7.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Axioskop 2 Plus	Zeiss
Färbeautomat BenchMark ULTRA	Ventana Medical Systems
Waage	Sartorius
Maxwell® RSC Instrument	Promega
Maxwell® 16 MDx Instrument	Promega
Qubit 3.0. Fluorometer	Life Technologies
Magnetplatte DynaMag™-96 Side	Thermo scientific
LightCycler® 480 Instrument	Roche
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Pipetboy	Brand
Spannungsgerät GPS 200/400	Pharmacia
Gelkammer	Peqlab
Geldokumentationssystem CN-300-WL/LC.	Peglab
Ion Chef™ Instrument	Life Technologies
Ion Torrent PGM™	Life Technologies

FlexCycler	Analytik Jena
Centrifuge/Vortex Combi-Spin FVL2400	Peqlab
Vortexer	Biozym
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf

### 2.7.2 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit	Promega
Maxwell® RSC DNA FFPE Kit	Promega
Qubit® dsDNA HS Assay Kits	Life Technologies
Ion Library TagMan® Quantitation Kit	Life Technologies
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	Life Technologies
Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit	Life Technologies
Ion 510 & Ion 520 & Ion 520 Kit-Chef	Life Technologies
Ion 520 Chip Kit	Life Technologies

### 2.7.3 Reagenzien

GelRed® Nucleic Acid Stain	Biotium
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
Desoxynukleotide (dNTP)	Thermo Scientific
10x Puffer II (ohne MgCl <sub>2</sub> )	Roche
25 mM MgCl <sub>2</sub>	Roche
AmpliTaq Gold® Polymerase	Life Technologies

### 2.7.4 Chemikalien

Xylol p.a.	VRW
Ethanol p.a.	Merck
LE Agarose	Biozym
Chloroform p.a.	VWR
Lithiumchlorid	Merck

## 2.7.5 Antikörper

CK 20 (M7019)	DAKO
P16 (06594441001)	Roche
P21 (556431)	BD Pharmigen
P53 (DO-7)	Novocastra
MIB-1 (M7240)	DAKO
p-HH3 (117C826)	IMGENEX
FGFR3 (sc-13121)	Santa Cruz Biotechnology

## 2.7.6 Puffer

5x TBE Puffer für die Gelelektrophorese

Endkonzentration in 1l

445 mM TRIS	Sigma-Adrich
445 mM Borsäure	Merck
12,5 mM EDTA	AppliChem

P2 Lysepuffer (auf 50ml auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O)

Reagenz	Menge	Hersteller
10 mM TRIS	1ml	Merck
1 mM EDTA	200 µl	Merck
1% Natriumlaurylsulfat.	10ml	Merck

## 2.7.7 Verbrauchsmaterialien

Benutzt wurden Materialien der Firmen Corning Incorporated, Beckman Coulter, Eppendorf, Zeiss, Falcon, Sarstedt, Neolab, Carl Roth GmbH, Greiner Bio- One, Becton Dickinson und Biozym.

## 2.7.8 EDV-Programme und Onlinesoftware

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
NanoDrop <sup>TM</sup> 2000/2000c Software (Version 1.4.1)	Thermo Fisch Scientific
AxioVision Software (Version 4.8.2.)	Zeiss
LightCycler® 480 Software (Version 1.5)	Roche
Ion AmpliSeq <sup>TM</sup> Designer	Life Technologies

Torrent Suite™ Software (Version 5.6)	Life Technologies
Ion Reporter™ Software (Version 5.6)	Life Technologies
SIFT	J. Craig Venter Institute
Polyphen-2	Harvard Medical School
Catalogue of somatic mutations (COSMIC)	Welcome Trust Sanger
CADD – Combined Annotation Dependent Depletion	University of Washington
Varsome	Saphetor SA
OncoKB	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
Nucleotide Blast, IGBlast	NCBI
EndNote 20	Thomson Reuters
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Adobe Photoshop	Adobe Incorporated

### 2.7.9 Panel

Alle Primer sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Alle anderen Primer sind mithilfe der Primer3web Software (Version 4.1.0) entworfen und über die Firma Sigma-Aldrich bestellt worden. Das verwendete Panel sieht man in Tabelle 11.

<b>Gene symbol</b>	<b>Transcript</b>	<b>Position (GRCh37/hg19)</b>	<b>Exon(s)</b>	<b>Amplicons*</b>
<i>ERCC2</i>	NM_000400.4	chr19: 45,854,887 - 45,873,423	CDS	41
<i>FGFR3</i>	NM_000142.4	chr4: 1,795,662 - 1,808,989	CDS	38
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	chr: 178,916,614 - 178,952,152	CDS	46
<i>PTEN</i>	NM_000314.8	chr10: 89,624,227 - 89,725,229	CDS	22
<i>STAG2</i>	NM_001042749.2	chrX: 123,156,478 - 123,234,447	CDS	66
<i>TP53</i>	NM_000546.5	chr17: 7,572,927 - 7,579,912	CDS	22

*CDS: coding sequence. Total coverage: 99.2 %. \*The amplicon lengths range between 125-175bp*

*Tab. 11: AmpliSeq Panel für die Analyse der NMIBC [90].*

### 2.7.10 Hersteller

Analytik Jena	Jena, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
BD Pharmigen	Franklin Lakes, NJ, USA
Biozym	Oldendorf, Deutschland
Brand	Wertheim, Deutschland
DAKO	Hamburg, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gilson	Middleton, WI, USA
IMGENEX	Bhubaneswar, Indien
Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Novocastra (Leica Biosystems)	Wetzlar, Deutschland
Peglab	Erlangen, Deutschland
Pharmacia	Uppsala, Schweden
Promega	Mannheim, Deutschland
Roche	Penzberg, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Dallas, TX, USA
Sartorius	Staufen, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Braunschweig, Deutschland
Ventana Medical Systems	Tucson, AZ, USA
VWR	Bruchsal, Deutschland
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientenkohorte

Eine Gruppe von 45 Patienten mit einem nicht-invasiven papillären Urothelkarzinom der Harnblase und einer pTa-Erstdiagnose wurde in die

Patientenkohorte für weitere Analysen aufgenommen. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Fälle war die Qualität der Schnitte und der Gewebeproben. Schnitte, die Artefakte aufwiesen, oder Schnellschnitte mit schlecht erhaltender Gewebsqualität wurden nicht in die Kohorte aufgenommen. Die klinischen Informationen der Fälle sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 zusammengefasst. Der Anteil zwischen Männer und Frauen betrug 2,75:1. 33 der 45 Patienten (73,3 %) waren Männer und 12 Frauen (26,7 %). Das Alter lag im Median bei 75 Jahren, mit einer Altersverteilung zwischen 50 und 95 Jahren. Nach der TNM-Klassifikation wurden 39 von 45 Fällen (86,6 %) als reine pTa-Fälle klassifiziert. Die restlichen 6 von insgesamt 45 Fällen (13,3 %) zeigten zusätzlich eine pT1 Läsion. 19 der 45 Fälle (42,2 %) hatten Tumore an multiplen Lokalisationen, d. h. an mindestens zwei Stellen der Harnblase, während die übrigen 26 Fälle (57,8 %) Tumoren an nur einer Lokalisation aufwiesen. Die häufigsten Lokalisationen der Tumoren waren die lateralen Wände (22,2 %) und die posteriore Wand der Harnblase (13,3 %). Seltener traten Tumoren im Bereich des Trigonums (6,6 %), des Apex (6,6 %) sowie der superioren und der anterioren Wand (jeweils 4,4 %) auf. Knapp die Hälfte aller Patienten hatte Rezidive (48,4 %), während 51,6 % keine Rezidive im Follow-up von zwei Jahren nach der Erstdiagnose aufwiesen. Aus den klinischen Daten von 44 Patienten ging hervor, dass 19 Patienten keine unmittelbare Therapie nach der Diagnose erhielten. Die 25 therapierten Patienten teilten sich fast gleichmäßig auf: 13 Patienten (29,5 %) erhielten eine Re-TUR-BT, während 12 Patienten (27,3 %) eine unmittelbare intravesikale Instillation erhielten.

Bei der Klassifikation der Fälle wurde die Konsensus-Diagnose durch drei Pathologen als Grundlage genommen. Fälle, die als PUNLMP klassifiziert wurden, erhielten keine Re-TUR-BT, und die Hälfte aller PUNLMP-Fälle erhielt eine intravesikale Instillation mit Mitomycin C (MMC). Knapp ein Drittel der Low-Grade-Fälle erhielten eine Re-TUR-BT, und fast genauso viele (26,1 %) erhielten eine intravesikale MMC-Instillation. Knapp jeder zweite Fall, der als High-Grade im Konsens diagnostiziert wurde, erhielt eine Re-TUR-BT (46,2 %), während 15 % eine intravesikale MMC-Instillation bekamen. Während des Follow-up von zwei Jahren erhielten 12 der 45 Patienten (27,3 %) keine weitere Therapie im

klinischen Verlauf. Die Mehrheit der Patienten (70,5 %) wurde jedoch erneut mittels TUR-B behandelt. Eine Re-TUR-BT während der zweijährigen Follow-up-Phase erhielten Patienten aller Tumorkategorien. Bei 4 von 44 Patienten (9,1 %) wurde im klinischen Verlauf eine Zystektomie durchgeführt. Kein Fall, der als PUNLMP klassifiziert wurde, war davon betroffen. Drei der vier Fälle waren High-Grade, und einer war Low-Grade. Knapp jeder vierte Patient (22,7 %) erhielt während der Follow-up-Phase eine weitere Instillation mit BCG oder Mitomycin C. Kein PUNLMP-Fall erhielt jedoch eine weitere Instillation.

	<b>n = 45 (%)</b>
<b>Altersmedian</b> (Bereich)	75 Jahre (50-95)
<b>Geschlecht</b>	n (%)
Mann	33 (73.3)
Frau	12 (26.6)
M:F Anteil	2.75:1
<b>Tumor Stage, TNM</b>	n (%)
pTa	39 (86.6)
pTa und pT1	6 (13.3)
<b>Tumorlokalisation</b>	
2 oder mehr Lokalisationen	19 (42.2)
Laterale Wand	10 (22.2)
Hinterwand	6 (13.3)
Trigonum	3 (6.6)
Apex	3 (6.6)
Superiore Bereich	2 (4.4)
Anteriore Wand	2 (4.4)
Detrusor Muskel im histologischen Schnitt	30 (66.7%)
<b>Unmittelbare Therapie nach Diagnose*(n=44)</b>	
Keine Therapie	19 (43.2%)
Unmittelbare intravesikale Instillation durch MMC	12 (27.3%)
Re-TUR-BT	13 (29.5%)
<b>Rezidiv in zwei Jahren follow up %*</b>	48.4%
<b>Weitere Therapie im klinischen Verlauf</b>	
Keine weitere Therapie	12 (27.3%)
Weitere BCG oder MMC Instillation	10 (22.7%)
TUR-B	31 (70.5%)
Zystektomie und TUR-B:	2 (4.5)
Zystektomie, TUR-B und BCG Therapie	2 (4.5)

MMC: Mitomycin C; BCG, Bacillus Calmette-Guerin (BCG); TUR-BT, transurethrale Resektion des Blasen Tumors. \*Die Prozentanteile wurden auf Basis von 44 Patienten berechnet, da die klinischen Daten eines Patienten fehlten.

*Tab. 12. Klinische Charakteristika der Patienten mit nicht-invasivem papillärem Urothelkarzinom [90].*

Parameter	N	PUNLMP (n = 8)	LG-UPC (n = 23)	HG-UPC (n = 14)	Alle (n=45)
Alter bei erster Zystoskopie	45	68.5 (13.1)	73.3 (9.0)	81.4 (12.1)	75 (100)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Geschlecht	45				
Mann n (%)		7 (87.5%)	16 (69.6%)	10 (71.4%)	33 (73,3%)
Frau n (%)		1 (12.5%)	7 (30.4%)	4 (28.6%)	12 (26,6%)
Staging	45				
pTa n (%)		8 (100%)	22 (95.7%)	9 (64.3%)	39 (88,6%)
pT1 n (%)		0 (0%)	1 (4.3%)	5 (35.7%)	6 (13,3%)
Anteil des Destrusor Muskel im histologischen Schnitt	44				
		4 (50%)	15 (65.2%)	11 (84.6%)	30 (68,2%)
<b>Unmittelbare Therapie nach der Erstdiagnose (n=44)</b>					
TURB En-bloc 1/0	44	0 (0%)	2 (8.7%)	1 (7.7%)	3 (6,8%)
Unmittelbare Intravesikale Instillation mit MMC	44	4 (50%)	6 (26.1%)	2 (15.4%)	12 (27,3%)
Re-TURB	44	0 (0%)	7 (30.4%)	6 (46.2%)	13 (29,5%)
<b>Weitere Therapie im Verlauf aufgrund von Rekurrenz</b>					
Weitere BCG oder MMC Instillation	44	0 (0%)	4 (17.4%)	6 (46.2%)	10 (22,7%)
Anzahl der Instillationen	44				
0 n (%)		8 (100%)	19 (82.6%)	7 (53.8%)	34 (77,3%)
1 n (%)		0 (0%)	3 (13%)	3 (23.1%)	6 (13,6%)
2 n (%)		0 (0%)	0 (0%)	1 (7.7%)	1 (2,3%)
3 n (%)		0 (0%)	0 (0%)	1 (7.7%)	1 (2,3 %)
6 n (%)		0 (0%)	1 (4.3%)	1 (7.7%)	2 (4,6%)
Zystektomie	44	0 (0%)	1 (4.3%)	3 (23.1%)	4 (9,1%)
Re-TURB	44				
0 n (%)		1 (12.5%)	7 (30.4%)	4 (30.8%)	12 (27,7%)
1 n (%)		4 (50%)	7 (30.4%)	2 (15.4%)	13 (38,5%)
2 n (%)		2 (25%)	6 (26.1%)	5 (38.5%)	13 (38,5%)
3 n (%)		1 (12.5%)	2 (8.7%)	1 (7.7%)	4 (9,1%)
4 n (%)		0 (0%)	1 (4.3%)	1 (7.7%)	2 (4,5%)

Tabelle 13: Parameter auf Basis der WHO 2014/2016 Klassifikation [90].

### 3.2 Histologische Klassifikation

Aus dem Report der Erstdiagnose durch den untersuchenden Pathologen sieht man die Graduierung des Tumors nach der 2004/2016-WHO-Klassifikation. Die Fälle wurden durch drei weitere Pathologen erneut als PUNLMP, LG-PUC oder HG-PUC klassifiziert. Für die Klassifikation der Schnitte wurden die Pathologen verblindet und hatten keine Kenntnis über die Klassifizierung aus der Erstdiagnose. Außerdem verlief die Klassifizierung durch die Pathologen unabhängig voneinander. Dabei wurde die Interobserver-Variabilität bestimmt, welche die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit der drei Untersucher widerspiegelt. Die Interobserver-Variabilität für Fälle, die als PUNLMP klassifiziert wurden, war mit 57 % am geringsten; bei LG-PUC lag diese bei 67 %. Am höchsten war die Übereinstimmung bei der Klassifikation von HG-PUC-Fällen mit 87 %. Dies wird noch einmal deutlich bei der Betrachtung des ermittelten Fleiss-Kappa-Index. So lag dieser bei der Klassifikation von PUNLMP (0,43) und Low-Grade-Fällen (0,41) relativ niedrig. Bei High-Grade-Fällen war die Übereinstimmung der drei Untersucher am größten, mit einem Fleiss-Kappa-Index von 0,81. In der histologischen Erstdiagnose wurden 18 von 45 Fällen (40 %) als PUNLMP, 14 Fälle (31,1 %) als LG-PUC und 13 Fälle (28,9 %) als HG-PUC klassifiziert. Nach der erneuten Beurteilung und Klassifikation der histologischen Schnitte durch drei Pathologen wurde ein Konsens gebildet. Dieser Konsens lag vor, wenn mindestens zwei der drei Pathologen sich auf eine bestimmte Graduierung festgelegt hatten. Nach dem Konsens der drei Untersucher waren nur 8 von 45 Fällen (17,8 %) PUNLMP, ungefähr die Hälfte aller Fälle (51,1 %) wurden als LG-PUC und 14 Fälle (31,1 %) als HG-PUC klassifiziert. Die Rezidivrate beim Follow-up war bei High-Grade-Fällen höher als erwartet. Sie lag bei 79,5 % im Follow-up zwei Jahre nach der Erstdiagnose, bei LG-PUC-Fällen war diese geringer (42,7 %) und bei PUNLMP (33,3 %) am geringsten ( $p = 0,14$ ). Die rezidivfreie Zeit nach der Erstdiagnose war bei den Fällen, die im Konsens der drei Pathologen als PUNLMP klassifiziert wurden, mit 34 Monaten am höchsten. Sie war kürzer bei LG-PUC-Fällen (23 Monate) und am kürzesten bei HG-PUC (5 Monate).

Grad	ODR	Diagnose P 1	Diagnose P 2	Diagnose P 3	Konsensus Diagnose	Interobserver Variabilität (%)	Fleiss Kappa
PUN-LMP	18 (40%)	16 (35.6%)	8 (17.8%)	6 (13.3%)	8 (17.8%)	57%	0.43**
LG-PUC	14 (31.1%)	15 (33.3%)	22 (48.9%)	27 (60%)	23 (51.1%)	67%	0.41**
HG-PUC	13 (28.9%)	14 (31.1%)	15 (33.3%)	12 (26.7%)	14 (31.1%)	87%	0.81**

PUN-LMP, papillary urothelial neoplasia of low malignant potential; LG-PUC, low-grade urothelial papillary carcinoma; HG-PUC, high-grade urothelial papillary carcinoma; P 1, 2, 3, Pathologe 1, 2 und 3. \*\* p Wert <0.001 Fleiss Kappa

Tab.

14. Interobserver Variabilität unter den einzelnen Tumorgaden nach der 2004/2016-WHO-Klassifikation[90].

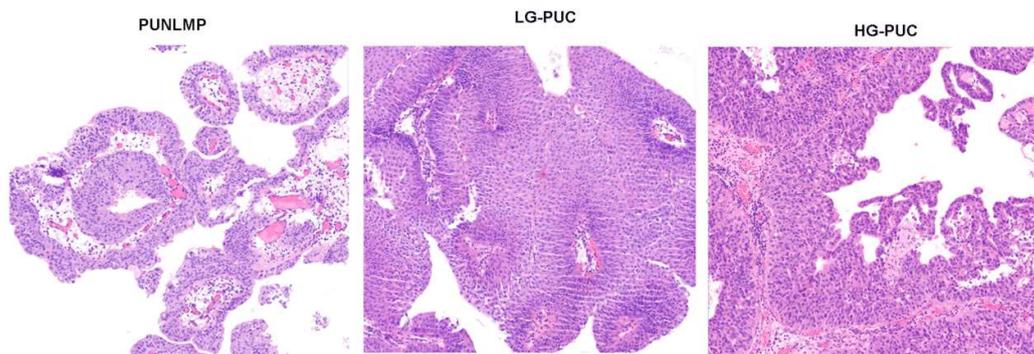


Abb. 3: Bilder histologischer Schnitte, die die Parameter verschiedener Tumorgade repräsentieren (PUN-LMP, LG-PUC und HG-PUC) [90].

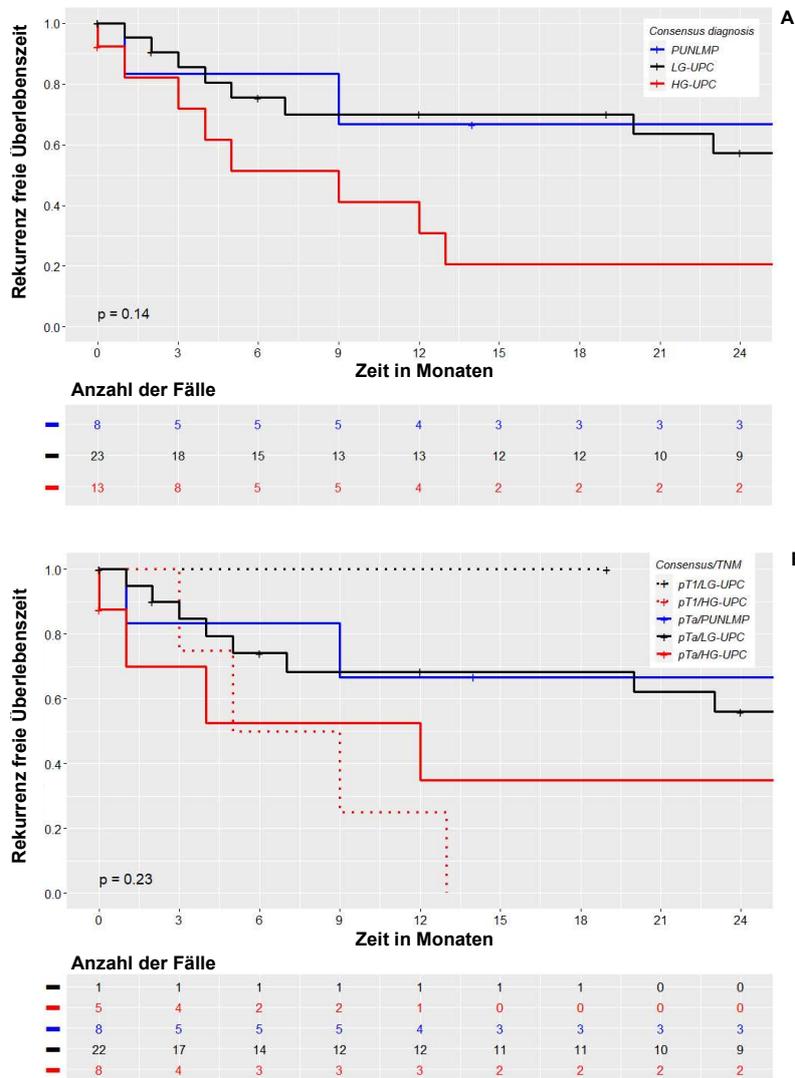
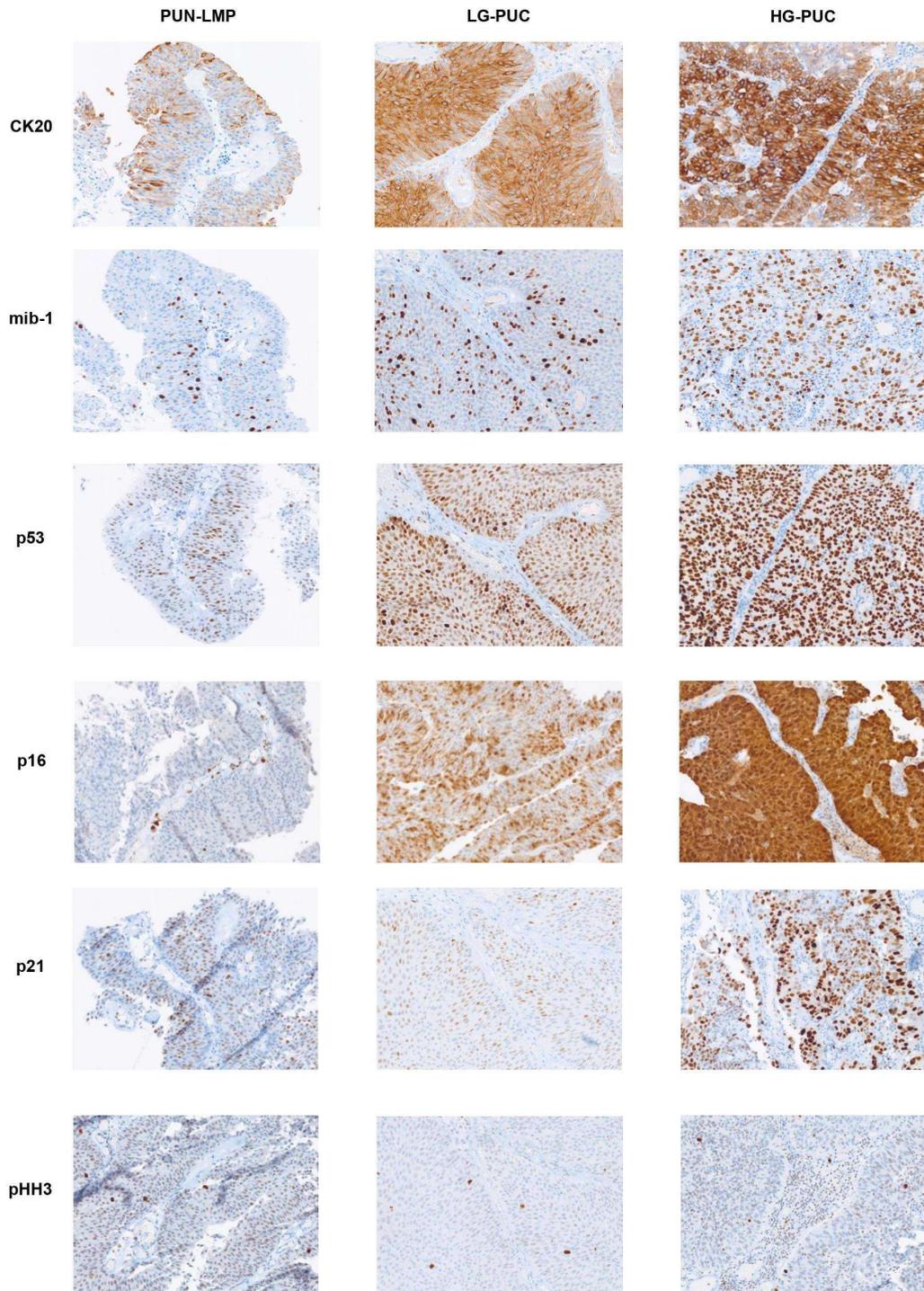


Abb. 4: **A.** Kaplan-Meier Analyse der Rekurrenz freien Überlebenszeit verglichen mit den Tumorgraden bei Konsens. **B.** Kaplan-Meier Analyse der Rekurrenz freien Überlebenszeit verglichen mit den Tumorgraden nach 2004/2016-WHO und TNM. PUN-LMP, papillary urothelial neoplasia of low malignant potential; LG-PUC, low-grade urothelial papillary carcinoma; HG-PUC, high-grade urothelial papillary carcinoma [90].

### 3.3 Immunhistochemie und Korrelation mit Grading

Anhand der Spearman-Korrelationsmatrix konnte bei den Histoscores der immunhistochemischen Schnitte eine signifikante positive Korrelation lediglich zwischen dem Proliferationsmarker MIB-1 und dem Mitosemarker p-HH3 (0,80) ermittelt werden. Die immunhistochemischen Marker CK20, der Mitosemarker p-HH3 und der Proliferationsmarker MIB-1 korrelierten mit einer schlechteren klinischen Prognose. Höhere Histoscores dieser Marker wurden bei Fällen festgestellt, die im Konsens als High-Grade klassifiziert wurden ( $p < 0,05$ ). Der Tumorsuppressor p53 zeigte ein heterogenes Muster der Färbung über die drei verschiedenen Tumorggrade hinweg. Nichtsdestotrotz war die Expression des Tumorsuppressors p53 bei Fällen, die als LG-PUC und HG-PUC klassifiziert wurden, höher als bei solchen, die als PUNLMP klassifiziert wurden ( $p = 0,06$ ). Außerdem zeigten Fälle, die im Konsens als PUNLMP klassifiziert wurden, geringere Expressionsraten für den immunhistochemischen Marker CK20 ( $p = 0,03$ ) sowie für den Proliferationsmarker MIB-1 und den Mitosemarker p-HH3 ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu LG-PUC- und HG-PUC-Fällen. Die Marker CK20 und p53 zeigten ähnliche Histocore-Werte bei LG- und HG-PUC-Fällen. Jedoch konnten bei der HG-PUC-Gruppe höhere Werte für den Proliferationsmarker MIB-1 und mehr Mitosen festgestellt werden als bei der LG-PUC- oder PUNLMP-Gruppe. Bei Fällen, die der LG-PUC- oder PUNLMP-Gruppe zugeordnet wurden und eine hohe Mitosezahl aufwiesen, waren die Mitosen auf die Basalzellschicht begrenzt und konnten nicht, wie bei der HG-PUC-Gruppe, ubiquitär im Urothel lokalisiert werden. Die Zellzyklusproteine p16 und p21 waren über die verschiedenen Grade hinweg heterogen exprimiert und wiesen keine signifikante Korrelation mit der histologischen Graduierung auf. 28 von 37 Fällen (75,7 %) zeigten eine geringe bis nicht vorhandene FGFR3-Expression. Innerhalb der LG-PUC-Fälle zeigten 6 von 20 Fällen eine Überexpression des FGFR3-Proteins, sodass der Histocore im Median für die LG-PUC-Gruppe am höchsten war ( $p = 0,03$ ). In nur 16 von 25 Fällen (64 %) korrelierte die FGFR3-Expression in den immunhistochemischen Schnitten mit dem Mutationsstatus, erkennbar durch das targeted NGS. Dies liegt daran, dass einige Mutationen im FGFR3-Gen zu einem

nicht-funktionellen Protein führen, wodurch es zu einer fehlenden Expression des FGFR3-Proteins im immunhistochemischen Schnitt kommt.



*Abb.5: Immunhistochemischen Färbungen für die einzelnen Tumorgaden PUN-LMP, Low-Grade und High-Grade, für die Proteinmarker CK20, mib-1, p53, p16, p21 und pHH3*

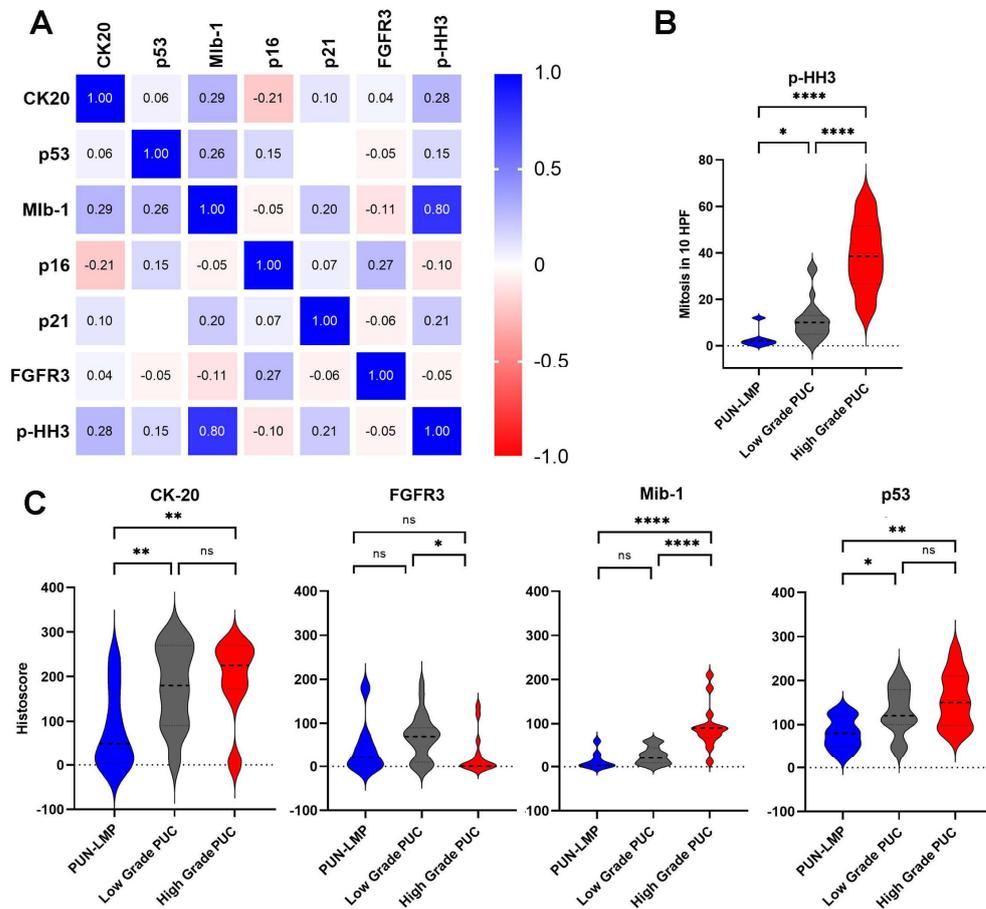


Abb. 6. Immunhistochemische Parameter **A**. Rangkorrelationsmatrix nach Spearman: Werte sind die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, blaue Farbe steht für positive und rote für negative Korrelation. **B**. Violin Plot vergleicht die Anzahl an gezählten Mitosen in 10 high power fields (HPF), angefärbt durch p-HH3, bei den einzelnen Tumorgaden für nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome. **C**. Violin Plots zu verschiedenen immunhistochemischen Markern verglichen bei den einzelnen Tumorgaden für nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome[90].

	CK20	Mib-1	p-HH3*	FGFR3	p16	p21	p53
PUN-LMP	60 (6-180)	3 (3-30)	2 (1-12)	9 (1-40)	10 (15-270)	150 (60-170)	90 (50-130)
LG-PUC	202 (110-270)	25 (9-45)	10 (5-15)	70 (10-82.5)	85 (17.5-180)	110 (57.5-160)	100-182.5 (127.5)
HG-PUC	225 (172-270)	90 (57-97.5)	38.5 (25.3-51.5)	26.3 (10-82.5)	25 (3-225)	97.5 (6-191.3)	142.5 (97.5-210)
p-Wert	0.027	<0.001	<0.001	0.032	0.065	<0.001	0.066

Histoscore Median (p25-p75); PUN-LMP, Papillary Urothelial Neoplasia of low malignant potential; LG-PUC, low grade urothelial papillary carcinoma; HG-PUC, high grade urothelial papillary carcinoma. \*Anzahl der Mitosen in 10 HPF (high-power fields)

*Tab. 15: Histoscores der Fälle, entsprechend der histologischen Graduierung [90].*

### 3.4 Mutationsanalyse

Das targeted NGS wurde bei insgesamt 37 Fällen durchgeführt. Dadurch konnten die Mutationen der Fälle erkannt und analysiert werden. Die durchschnittliche mittlere Lesetiefe des NGS lag bei 6.820 Reads (1.141–23.628). Insgesamt konnten 80 Mutationen gefunden werden. Der Großteil davon (66 von insgesamt 80 Mutationen, 82,5 %) waren Missense-Punktmutationen, 9 waren Nonsense-Mutationen (11,25 %) und die restlichen 5 Mutationen waren Frameshift-Mutationen (6,25 %). Die Mutationen wurden analysiert und in verschiedenen Quellen bezüglich ihrer Pathogenität überprüft. Alle gefundenen Missense-Mutationen hatten nach der Analyse mit SIFT, PolyPhen-2 und CADD eine schädigende, pathologische Vorhersage. Die Variant Allele Frequencies (VAF) lagen zwischen 3 % und 93 % (Durchschnitt: 34 %). Am häufigsten waren die untersuchten Fälle im FGFR3-Gen mutiert. Dabei war die häufigste Mutation die Punktmutation S249C im FGFR3-Gen. Fälle, die als PUNLMP klassifiziert wurden, hatten häufig eine Mutation im FGFR3-Gen (57 %, 4/7) und keine Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53. Außerdem konnten bei PUNLMP-Fällen selten Mutationen in den Genen ERCC2, PTEN und PIK3CA festgestellt werden (28,5 %, 2/7). Diese traten meist gemeinsam in den Fällen auf. Mutationen im FGFR3-Gen traten nicht nur bei PUNLMP-Fällen auf, sondern auch bei Fällen, die im Konsens als LG-PUC klassifiziert wurden. Der Großteil

der LG-PUC-Fälle hatte Mutationen im FGFR3-Gen (85 %, 17/20). Außerdem traten neben Mutationen im FGFR3-Gen bei 11 von 20 LG-PUC-Fällen gleichzeitig weitere Mutationen auf, z. B. in den Genen PIK3CA (63,6 %, 7/11), STAG2 (54,5 %, 6/11) und ERCC2 (45,4 %, 5/11). Ein kleiner Teil der LG-PUC-Fälle wies Mutationen im TP53-Gen (10 %, 2/20) auf. In den HG-PUC-Fällen hatten weniger als die Hälfte aller Fälle Mutationen im FGFR3-Gen (40 %, 4/10). In dieser Gruppe gab es die meisten Mutationen im TP53-Gen (30 %, 3/10). Fälle, die im TP53-Gen mutiert waren, zeigten immer einen hohen Histoscore für das Tumorsuppressorprotein p53. Jedoch gingen umgekehrt hohe p53-Expressionen in den immunhistochemischen Schnitten nicht immer mit einer Mutation im TP53-Gen einher. Mutationen im PTEN-Gen waren selten und traten nur vereinzelt sowohl bei PUNLMP- als auch bei HG-PUC-Fällen auf. In Abbildung 8 sind Kaplan-Meier-Analysen für die einzelnen Mutationen dargestellt. Dabei wird die rezidivfreie Überlebenszeit bei Vorhandensein einer der untersuchten Genmutationen mit der Überlebenszeit der Fälle ohne eine Mutation des jeweiligen Gens verglichen. Es fällt auf, dass in der Analyse keine signifikanten Unterschiede in der rezidivfreien Überlebenszeit bei Fällen ohne und mit FGFR3-, STAG2- oder PIK3CA-Mutationen bestehen. Bei Fällen mit PIK3CA-Mutationen ist die rezidivfreie Überlebenszeit sogar länger als bei Fällen ohne PIK3CA-Mutationen. Lediglich bei Fällen, die eine TP53-Mutation aufweisen, zeigt sich eine signifikant niedrigere rezidivfreie Überlebenszeit als bei Fällen ohne TP53-Mutationen. Unter allen untersuchten Genen konnte lediglich eine signifikante Korrelation zwischen Mutationen im TP53-Gen und der rezidivfreien Überlebenszeit nach Erstdiagnose festgestellt werden ( $p = 0,024$ ).

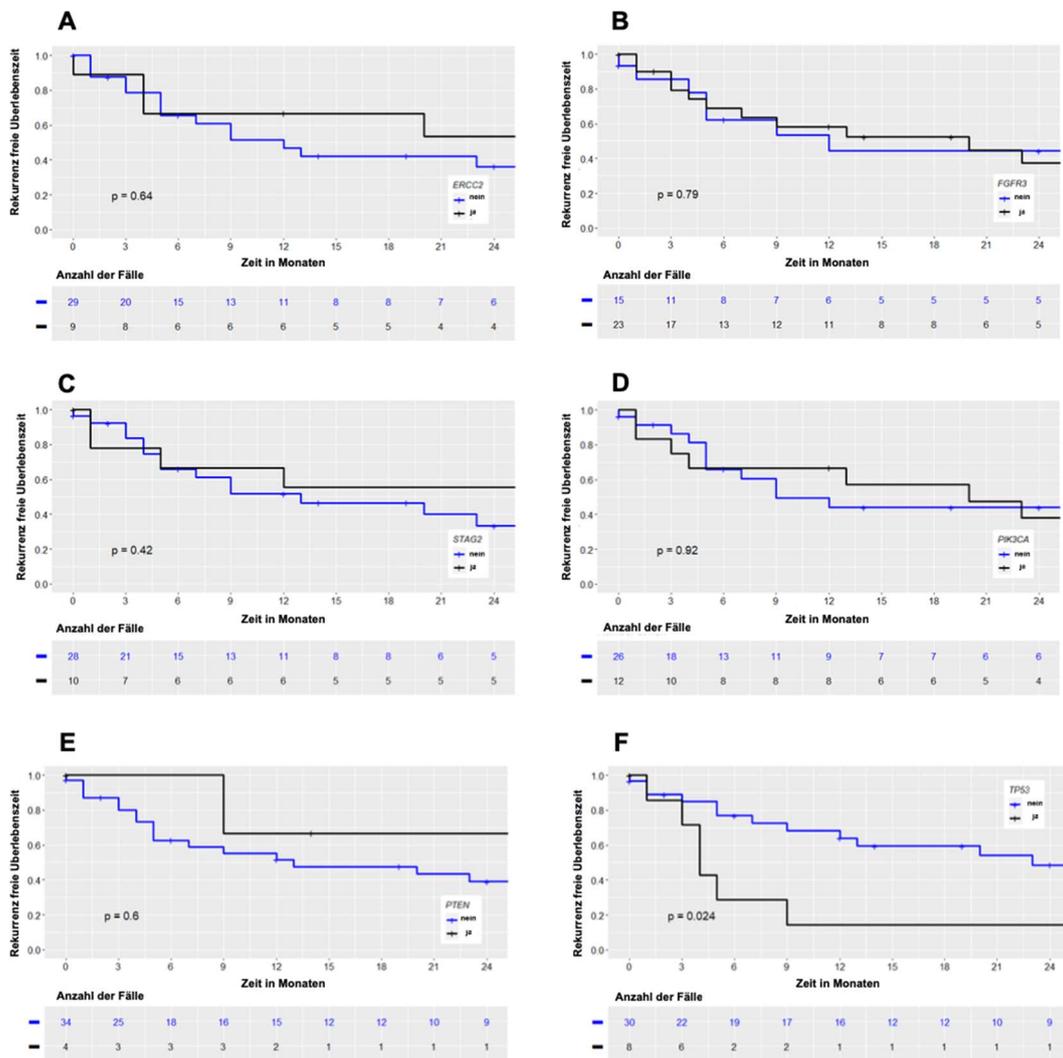


Abb. 7: Kaplan-Meier Analysen der Rekurrenz freien Überlebenszeit, verglichen bei Vorhandensein und Nicht-Vorhandensein der einzelnen untersuchten Genmutationen. **A** ERCC2. **B** FGFR3. **C** STAG2. **D** PIK3CA. **E** PTEN. **F** TP53 [90].

### 3.5 Cluster Analyse

Alle Fälle durchliefen eine Cluster-Analyse. Auf Basis der angegebenen Variablen, dazu zählten die Immunhistochemie, die Mutationsanalyse und die Konsens-Diagnose, wurden die Fälle in bestimmte Cluster eingeteilt. Die Cluster-Analyse teilte die Fälle in zwei spezifische Cluster ein. Cluster 1 umfasste PUNLMP- und LG-PUC-Fälle mit einer geringen Proliferationsrate und einer geringen Anzahl an Mitosen. Außerdem zeigten die Fälle in Cluster 1 Mutationen in den Genen FGFR3 und STAG2. Im Gegensatz dazu wurden in Cluster 2 vor

allem HG-PUC-Fälle aufgenommen, die einen hohen Proliferationsindex und eine hohe Anzahl an Mitosen aufwiesen. Außerdem zeigte sich bei den Fällen in Cluster 2 eine starke CK20-Expression sowie Mutationen im TP53-Gen, jedoch ein Wildtyp im FGFR3-Gen. Die Cluster-Analyse korrelierte mit der klinischen Prognose der Fälle. Verglichen mit Cluster 1, in dem sich PUNLMP- und LG-PUC-Fälle befanden, hatten die Fälle aus Cluster 2 eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit ( $p = 0,029$ ). Zusätzlich wurde eine weitere Cluster-Analyse durchgeführt, bei der eine Verteilung auf drei Cluster vorgenommen wurde. Das Ziel war es zu überprüfen, ob eine Zuordnung in die drei verschiedenen Gruppen gemäß der 2004/2016-WHO-Klassifikation (PUNLMP, LG-PUC, HG-PUC) erfolgt. Jedoch kam es dabei zu einer Mischung aus PUNLMP- und LG-PUC-Fällen in Cluster 1 und 2. Lediglich Fälle, die im Konsens als HG-PUC klassifiziert wurden, bildeten nahezu eigenständig ein separates Cluster 3.

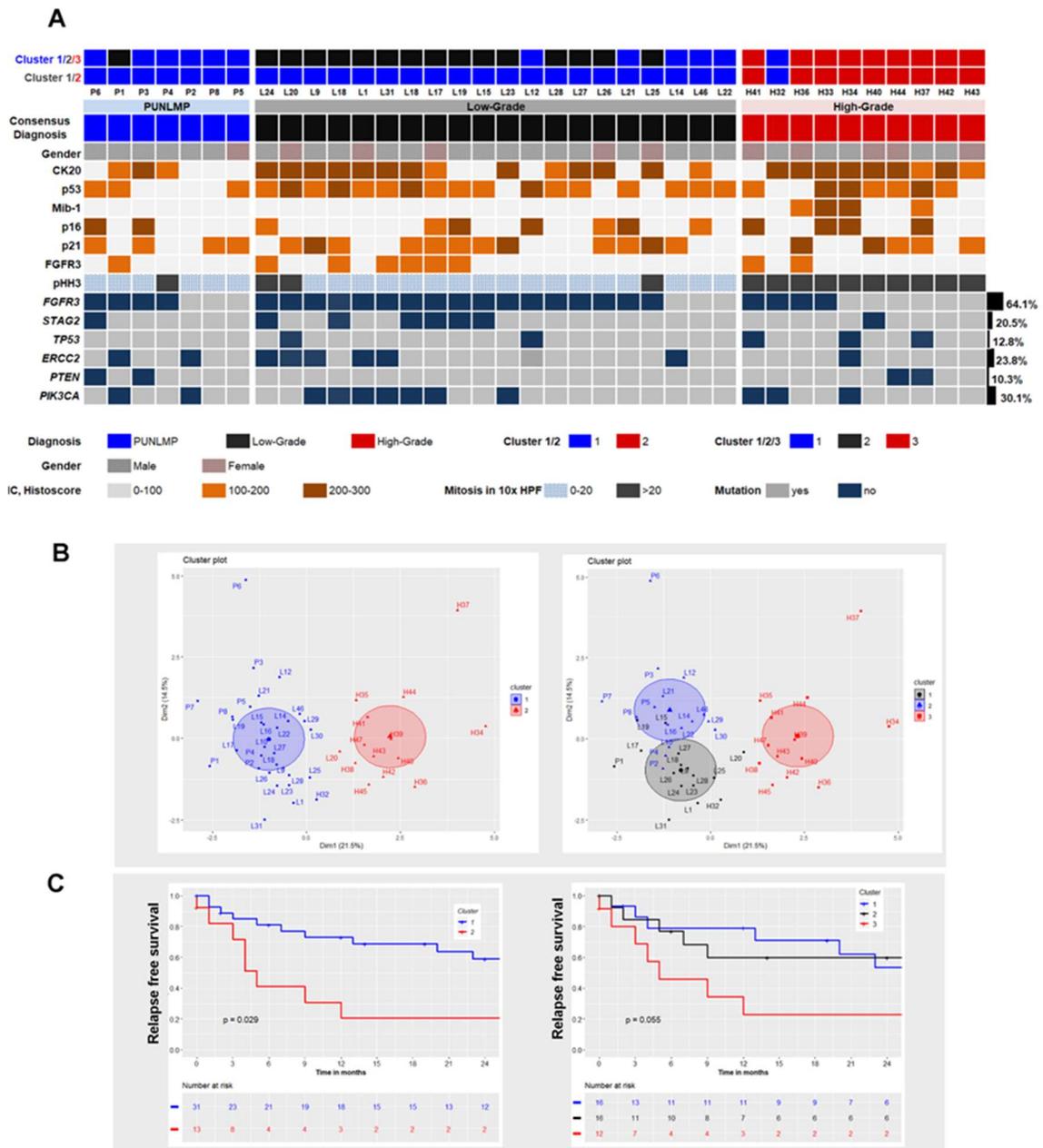


Abb. 8 [90]: **A.** Eine Übersicht über die Mutationen und immunhistochemischen Ergebnisse für die einzelne Diagnosekategorie. **B.** Clusteranalyse für zwei und drei Clustergruppen (links, rechts). **C.** Kaplan-Meier Plots der Rezidiv freien Überlebenszeit für die einzelnen Cluster [90].

Bei der Kaplan-Meier-Analyse der Verteilung der Fälle auf drei Clustern zeigt sich die kürzeste rezidivfreie Überlebenszeit in Cluster 3, das fast ausschließlich aus Fällen besteht, die im Konsens als High-Grade klassifiziert wurden. In den Clustern 1 und 2, die aus PUNLMP- und Low-Grade-Fällen bestehen, zeigt sich eine relativ ähnliche rezidivfreie Überlebenszeit. Die Kaplan-Meier-Analyse

zeigte eine signifikante Korrelation zwischen den drei Clustern und der rezidivfreien Überlebenszeit. Diese war in den Cluster-Gruppen 1 und 2, die aus LG-PUC- und PUNLMP-Fällen bestehen, höher ( $p = 0,055$ ). In Cluster 3 war die Rezidivrate am höchsten. Zur Analyse der Korrelation zwischen der rezidivfreien Überlebenszeit und den Clustern wurde ein proportionales Cox-Regression-Modell angewandt. Univariate und multivariate Analysen zeigten, dass in der untersuchten Fallkohorte die klinischen Charakteristika und die Therapie die rezidivfreie Überlebenszeit nicht beeinflusst haben. Lediglich Re-TUR-B-Therapien zeigten eine signifikante Korrelation mit der rezidivfreien Überlebenszeit, wurden jedoch nicht berücksichtigt, da Re-TUR-B-Eingriffe nur bei HG-PUC-Fällen durchgeführt wurden. Multivariable Analysen bestätigten, dass die klinischen Charakteristika und die Therapieart keinen Einfluss auf die rezidivfreie Überlebenszeit hatten. Lediglich die Cluster-Gruppen, die anhand der histologischen Kriterien, der Proteinexpression und des Mutationsstatus eingeteilt wurden, zeigten eine signifikante Korrelation mit der rezidivfreien Überlebenszeit.

Marker	Cluster 1	Cluster 2	p-Wert
<b>Immunohistochemie</b>	Median (p25-p75)	Median (p25-p75)	Wilcoxon rank-sum test
CK20	160 (80-240)	225 (172.5-270)	0.15
p53	110 (80-160)	158.7 (107.5-212.5)	0.013
MIB-1	15 (3-33.9)	90 (68.5-97.5)	<0.001
FGFR3	60 (1-80)	3 (1-65)	0.101
p-HH3*	8 (3-12)	38.5 (25.7-51.5)	<0.001
<b>Mutations Status</b>	n (%)	n (%)	$\chi^2$ test
FGFR3	18 (40%)	3 (6%)	0.028
STAG2	8 (17.2%)	1 (2.2%)	0.236
TP53	2 (4.4%)	5 (11.1%)	0.023
ERCC2	7 (15.5%)	4 (8.8%)	0.717
PIK3CA	10 (22.2%)	3 (6.6%)	0.724

Immunohistochemie: Daten sind als Median (p25-p75) angezeigt vom Histoscore Wert oder (\*) Anzahl der Mitosen in 10 HPF. Mutations Status wird angezeigt als Zahl der mutierten Fälle (%).

Tab. 16. Vergleich von Proteinexpression und Mutationsstatus zwischen den Clustergruppen 1 und 2 [90]

## 4 Diskussion

### 4.1 Grenzen der 2004/2016 WHO Klassifikation

Wir konnten in unserer Studie eine multiparametrische Klassifikation für nicht-invasive papilläre urotheliale Tumore der Harnblase ausarbeiten. Diese multiparametrische Klassifikation umfasst drei wichtige Parameter: den Mutationsstatus, den Immunphänotyp und die histologische Klassifikation der Tumoren. Das Ziel der multiparametrischen Klassifikation ist es, im Vergleich zur alleinigen histologischen Klassifikation, die Risikobeurteilung der Tumore zu verbessern. In vorherigen und auch in aktuellen Studien wurde eine geringe Übereinstimmung bezüglich des Gradings der papillären Urothel-Tumoren unter den Untersuchern beschrieben (*interobserver variability*). Jedoch ist eine genaue Graduierung entscheidend für die Therapieentscheidung. Die Wahl der optimalen Therapie geht mit einem geringeren Risiko für Invasion und Rezidiv einher [31]. Die Graduierung der Tumore verläuft auf Basis der morphologischen Parameter (Mitosen, Architektur, Zytologie) der histologischen Schnitte. Jedoch können diese Parameter unterschiedlich in die Graduierung der Tumore gewichtet werden. Es gab in der Vergangenheit Versuche, die Kriterien für die 2004/2016-WHO-Klassifikation klar zu definieren [91]. Dennoch nehmen subjektive Faktoren der Untersucher bei der Graduierung der Tumore einen Platz ein, was einen Einfluss auf die *interobserver variability* hat. Bei der Graduierung von papillären Urothel-Tumoren ist die Unterscheidung zwischen PUN-LMP und LG-PUC besonders schwierig. Beide Entitäten haben eine typische papilläre Architektur mit Urothel-bedeckten Papillen und zeigen ein Fehlen von Mitosen. Oft ist das einzig definierende Kriterium das Vorhandensein von Atypien und Unordnung im Epithel, was oft subjektiv beurteilt wird. In den PUN-LMP-Fällen wirkt das Urothel oft dicker mit mehreren Schichten, jedoch sind nur wenige bis keine Atypien erkennbar. Bei LG-PUC-Fällen erkennt man bei niedriger Vergrößerung eine ordentlich angeordnete papilläre Struktur mit moderaten Atypien [92]. In unserer Studie, wie auch in der Literatur, ergab sich die geringste Übereinstimmung der Untersucher bei der Graduierung von PUN-LMP Fällen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, PUN-LMP Fälle als LG-PUC zu klassifizieren.

Außerdem ist die Rekurrenz Rate bei beiden Entitäten, PUN-LMP und LG-PUC, relativ gleich hoch. In Studien schwanken die Rekurrenz Raten für PUN-LMP-klassifizierte Fälle. Ursache der schwankenden Zahlen könnten wechselnden Klassifikationskriterien sein. Die Rekurrenz Rate schwankt bei PUN-LMP Fällen zwischen 17-35 %, bei LG-PUC zwischen 48-71 % und bis zu 78 % bei Fällen, die als HG-PUC klassifiziert wurden. Das Invasionsrisiko bei PUN-LMP Fällen liegt zwischen 1-3 % etwas höher ist es bei LG-PUC-Fällen mit 5% und mit weitem Abstand ist das Risiko für Invasion bei HG-PUC-Fällen mit bis zu 45% am höchsten [25].

Die Einteilung nicht-invasiver Urothelkarzinome der Harnblase nach der 2004/2016-WHO Klassifikation stellt eine Herausforderung für Pathologen dar. Gründe für die Schwierigkeiten bei der Klassifikation liegen vor allem in der Unterscheidung zwischen PUN-LMP- und Low-Grade Fällen, die mit einer relativ hohen *interobserver variability* einhergeht. In der 2004/2016-WHO Klassifikation sind die Parameter für die Klassifikation festgelegt. Dazu gehören die architekturellen und zytologischen Eigenschaften der histopathologischen Schnitte. Allerdings sind die Parameter nicht klar definiert, sodass ein Spielraum bei der Interpretation bleibt. Ein Beispiel hierfür ist die Anzahl der Mitosen: Eine hohe Anzahl an Mitosen sowie eine atypische Form korrelieren mit einem hohen Grading. Jedoch wird kein klarer Cut-off-Wert für die Anzahl der Mitosen in einer bestimmten Gruppe innerhalb der WHO 2004/2016-Klassifikation angegeben. Vergleicht man dies mit anderen Klassifikationssystemen, beispielsweise der Klassifikation von invasiven Mammakarzinomen mit dem von Elston und Ellis modifizierten Bloom-Richardson-Grading (BRE-Gradierung), bei dem klare Cut-off-Werte für die Anzahl an Mitosen festgelegt sind, zeigt sich ein Unterschied: In der WHO-2004/2016-Klassifikation der nicht-invasiven papillären Urothelkarzinome gibt es keinen festen Cut-off-Wert für die Mitosen in einer bestimmten Klassifikationsgruppe. Nicht nur die Anzahl der Mitosen, sondern auch andere Parameter sind nicht klar festgelegt. Deshalb bleibt bei der Klassifikation der Tumoren ein Interpretationsspielraum für den Pathologen bestehen, was die Werte für die *interobserver variability* erklärt.

Die WHO-Klassifikation von 1973, welche die nicht-invasiven Urothelkarzinome in G1, G2 oder G3 einteilte, wurde überarbeitet und von einem neuen System, der WHO-2004 Klassifikation, abgelöst. 2016 wurde die Klassifikation erneut modifiziert. Dabei wurde eine neue Tumorentität eingeführt: die PUN-LMP. Der Zweck der Einführung dieser neuen Entität war es, Tumoren mit minimalen Atypien diagnostizieren und klassifizieren zu können. Außerdem sollte die neue Entität die Reproduzierbarkeit der Diagnose verbessern sowie eine bessere Korrelation zwischen klinischer Prognose und histopathologischer Diagnose ermöglichen [93]. In vorangegangenen Studien wurde festgestellt, dass es weder bei der Rezidivfreien Überlebenszeit noch bei der invasionsfreien Überlebenszeit, signifikante Unterschiede zwischen Fällen gibt, die als PUN-LMP oder LG-PUC klassifiziert wurden. Zudem ist eine Abnahme der als PUN-LMP klassifizierten Fälle zu beobachten, sodass sich die Frage nach der klinischen Relevanz der Entität PUN-LMP stellt [94]. Des Weiteren konnte nach einer Überprüfung aller vorhandenen relevanten Datensätze keine genaue Abgrenzung im Hinblick auf die histopathologischen Parameter der WHO-2004/2016 Klassifikation, zwischen den beiden Tumorentitäten PUN-LMP und LG-PUC, festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich keine Unterschiede in den molekularen Eigenschaften oder der klinischen Prognose [95]. Außerdem gibt es keinen Konsens über ein klar abgegrenztes, unterschiedliches Therapieregime für die beiden Entitäten [96].

## **4.2 Proteinexpression als prognostischer Marker**

Histologische Parameter zur Graduierung von nicht-invasiven papillären Urothelkarzinomen der Harnblase sind aufgrund ihrer subjektiven Beurteilung limitiert. Deshalb wurden weitere Marker zur Graduierung der Tumoren untersucht. Dazu gehören u. a. die Anzahl der Mitosen, die Proliferationsrate und weitere spezifische immunhistochemische Marker. Die Anzahl der Mitosen zeigte in Studien, in denen die mitotische Aktivität mithilfe von semi-quantitativen Methoden untersucht wurde, eine geringe Reproduzierbarkeit für die Graduierung der Tumoren und eine schwache Korrelation mit der klinischen Prognose der Patienten [91]. Jedoch zeigten Studien, die bei Patienten mit einem

Mammakarzinom durchgeführt wurden, dass die Bestimmung der Anzahl an Mitosen mit quantitativen Methoden verbessert werden kann [97]. In unserer Studie wurde der immunhistochemische Marker p-HH3 zur Bestimmung der Anzahl an Mitosen genutzt. Dabei war das Ziel, die Subjektivität bei der Bestimmung von Mitosen zu reduzieren. Jedoch sollte angemerkt werden, dass eine p-HH3-Färbung nicht direkt mit einer Zählung von Mitosen im HE-Schnitt verglichen werden kann. Eine hohe Anzahl an Mitosen (>20 Mitosen in 10 HPF) konnte in allen HG-PUC Fällen beobachtet werden. Dies zeigt, dass der immunhistochemische Marker p-HH3 ein nützlicher Parameter für die Graduierung von nicht-muskelinvasiven papillären Urothel-Tumoren der Harnblase ist. Neben dem Marker für Mitosen p-HH3 ist der Proliferationsmarker mib-1 ein hilfreicher Parameter bei der Graduierung von Tumoren. Jedoch ist eine Überschneidung der Histoscore-Werte für mib-1 bei PUN-LMP und LG-PUC zu erkennen, was den Marker mib-1 als alleinigen Graduierungsparameter ausschließt [98]. In einigen Studien werden die Marker CK20 und p53 als objektive Marker für urotheliale Dysplasien genannt [99]. Im normalen Urothel wird CK20 lediglich in den Umbrella-Zellen exprimiert. Eine sehr starke und diffus verteilte Färbung deutet hingegen auf eine Dysplasie im Urothel hin und ist oft bei HG-PUC Fällen charakteristisch [100]. Jedoch traten atypische CK20-Expressionen nicht nur in HG-PUC-Fällen auf, sondern auch in PUN-LMP und LG-PUC, weshalb CK20 nicht als alleiniger Parameter für die Tumorgraduierung genutzt werden sollte [101].

### **4.3 Mutationsanalyse der Fälle**

In den letzten Jahren wurden die Technologien für die Sequenzierung von Genen weiterentwickelt. Dieser Fortschritt geht mit einem besseren Verständnis für die Mutationslandschaft und ihres Einflusses auf die Prognose der urothelialen Karzinome einher. Dieses verbesserte Verständnis der Mutationen in urothelialen Tumoren führt zu einer Reihe verschiedener molekularer Klassifikationen für das Harnblasenkarzinom. Nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome werden als genomisch stabile Tumoren beschrieben, charakterisiert durch *FGFR3*-Mutationen oder chromosomale Translokationen in 70% der LG-PUC-Fälle [102].

Dies könnte für eine frühe urotheliale Hyperplasie ursächlich sein [103]. Das am häufigsten mutierte Gen in unserer Studie war das *FGFR3* Gen (64,1%). Wie erwartet, waren *FGFR3*-Mutationen mit einem nicht High-Grade Phänotyp assoziiert. Aktivierende *PIK3CA*-Mutationen und inaktivierende Mutationen des Kohesin-Komplex-Tumorsuppressorgens *STAG2* scheinen eine sekundäre Rolle in der Diagnostik von nicht-invasiven urothelialen Harnblasenkarzinomen zu spielen, da diese in der analysierten Fallkohorte meist zusammen mit Mutationen im *FGFR3* Gen auftraten [104]. Dies deutet darauf hin, dass die Gene *STAG2* und *PIK3CA* mit einem geringen Invasionsrisiko und einer besseren Prognose assoziiert sind. Umgekehrt zeigen HG-PUC Fälle sowie muskelinvasive Harnblasenkarzinome Mutationen in den Genen *TP53*, *ERCC2* und *PTEN* [105]. Pathologische *TP53*-Mutationen traten nur selten auf, und wenn sie vorkamen, dann ausschließlich in LG-PUC- und HG-PUC- Fällen. Dies liegt nahe, dass das Tumorsuppressorgen *TP53* mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert ist. Die DNA-Helikase *ERCC2* wurde in vorherigen Studien als Biomarker für die Sensitivität gegenüber Cisplatin-Therapien bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen beschrieben. Es scheint auch, dass sie einen Effekt auf die Tumorgenese von nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen, hat [106]. Mutationen im *ERCC2* Gen konnten in allen Graduierungen der Fälle gefunden werden. Der Tumorsuppressor *PTEN* ist sehr oft in MIBC (90%) und seltener in NMIBC (40%) mutiert [107]. Bei der Analyse unserer Fallkohorte wurden jedoch Inaktivierungen des Tumorsuppressorgens *PTEN* in 2 von insgesamt 4 PUNLMP-Fällen festgestellt. Es bleibt abzuwarten, ob Fälle, die als PUN-LMP oder LG-PUC klassifiziert wurden, aber Mutationen im *PTEN* oder *TP53* Gen aufweisen, die eigentlich mit HG-PUC Fällen assoziiert sind, ebenfalls ein höheres Invasions-, und Rezidiv Risiko haben.

#### **4.4 Clusteranalyse der Fälle**

Bei der Cluster-Analyse aller Fälle wurden alle erhobenen Parameter in Betracht gezogen, um die Fälle in Cluster einzuteilen. Dazu gehören die immunhistochemischen Eigenschaften sowie die Mutationen in den untersuchten Genen. Dabei wurde analysiert, ob es Gemeinsamkeiten in Bezug auf die

untersuchten Parameter bei den Fällen gibt, die der gleichen WHO 2004/2016 zugeordnet sind. Die Analyse ergab eine Einteilung aller Fälle in zwei verschiedenen Cluster. Diese Einteilung in zwei Clustern war somit nicht kongruent mit der WHO 2004/2016 Klassifikation, die die Tumore in drei verschiedene Klassifikationsgruppen einteilt. Im ersten Cluster befanden sich Fälle mit einer niedrigen Proliferationsrate und einer geringen Anzahl an Mitosen. Dementsprechend waren die Histoscores für mib-1 und pHH3 niedrig. Außerdem zeigten Fälle in Cluster 1 Mutationen in den Genen *FGFR3* und *STAG2*. Diese Fälle wurden im Konsens der Pathologen als PUN-LMP oder Low-Grade klassifiziert. In Cluster 2 befanden sich Fälle, die zumeist Mutationen im *TP53*-Gen und Wildtyp im *FGFR3* Gen aufwiesen. Diese Fälle hatten außerdem einen hohen Histoscore für die immunhistochemischen Marker mib-1 und pHH3. Der Großteil der Fälle in Cluster 2 wurde im Konsens der Pathologen als High-Grade klassifiziert und zeigte eine kürzere Rezidiv-freie Überlebenszeit als die Fälle in Cluster 1. Dies verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Abgrenzung zwischen den Tumorentitäten PUN-LMP und LG-PUC. Beide Entitäten zeigten in unserer Cluster-Analyse Ähnlichkeiten in den Parametern der Mutationsanalysen und der immunhistochemischen Analysen. Im Gegensatz dazu war die Abgrenzung der Fälle, die als High-Grade diagnostiziert wurden, klarer, da diese in der Cluster-Analyse aufgrund ihrer ähnlichen Parameter separat als eigenes Cluster gruppiert wurden. Neben der ersten Cluster-Analyse zeigte eine zweite Cluster-Analyse, bei der eine Gruppierung in drei Cluster vorgegeben wurde, ein ähnliches heterogenes Bild. Dabei konnte festgestellt werden, dass LG-PUC- und PUNLMP-Fälle erneut gemeinsam auf zwei Cluster verteilt waren. Cluster 3 bestand zumeist aus High-Grade-Fällen. Bei beiden Kaplan-Meier-Clusteranalysen zeigte sich, dass eine klare Abgrenzung der Parameter zwischen Fällen, die als PUNLMP und LG-PUC diagnostiziert wurden, nicht möglich ist. Deshalb stellt sich die Frage nach der Relevanz der WHO-2004/2016-Klassifikation, die die Fälle in verschiedene Gruppen einteilt, und nach der Konsequenz der PUNLMP-Klassifikation.

## 4.5 Limitationen der Studie

Limitationen der Studie waren die begrenzte Anzahl an Fällen, die untersucht wurden. Außerdem wurde nur eine begrenzte Zahl an Proteinen auf ihre Expression und Gene auf ihre Mutationen untersucht. Die Studie zeigte, dass die Anwendung von multiparametrischen Klassifikationen die Diagnostik und die Vorhersagen über den klinischen Verlauf verbessern kann. Deshalb sollte die multiparametrische Klassifikation an einer größeren Fallkohorte genauer analysiert werden. Im Zeitalter der personalisierten Medizin ist die Anwendung von molekularen Panels oder immunhistochemischen Markern entscheidend für die Auswahl der bestmöglichen Therapie zur Verbesserung der Prognose von Harnblasenkarzinomen. Die Tumorgrade PUNLMP und LG-PUC können früh diagnostiziert werden. Deshalb ist eine frühe Diagnose dieser Entitäten wichtig, um die weitere Progression des Tumors zu verhindern und somit das Invasions- und Rezidivrisiko zu minimieren. Dabei können multiparametrische Klassifikationen die Diagnose verbessern und somit auch den klinischen Verlauf. Multiparametrische Klassifikationen sollten daher bei größeren Fallkohorten evaluiert und validiert werden.

## 4.6 Fazit

Über die letzten Jahre haben sich Klassifikationssysteme, die mehrere verschiedene diagnostische Ebenen abdecken, als wichtiges Mittel bei der Diagnostik und Beurteilung von Tumoren durchgesetzt. Durch multiparametrische Klassifikationssysteme kann das tumorbiologische Verhalten von Tumoren und Entitäten wie PUNLMP, deren diagnostische Reproduzierbarkeit gering ist, besser verstanden werden. Außerdem gibt es starke Korrelationen zwischen multiparametrischen Klassifikationen und dem klinischen Verlauf der Tumoren. In unserer Studie haben wir gezeigt, dass es einige gemeinsame histologische, immunhistologische und genetische Parameter bei den Entitäten PUNLMP und LG-PUC gibt. Die Überlappung der Parameter bei PUNLMP- und LG-PUC-Fällen zeigt die Schwierigkeit der verlässlichen diagnostischen Unterscheidung der beiden Entitäten. Dies führt zu der Frage, ob PUNLMP und LG-PUC nicht zwei eigenständige Entitäten sind,

sondern vielmehr ein biologisches Kontinuum repräsentieren, das unzureichend durch die alleinige histologische Beurteilung abgedeckt ist und ergänzt werden sollte durch weitere molekulare und immunhistochemische Parameter für eine bessere Risikobeurteilung der Fälle. Durch die begrenzte Anzahl an Fällen, die in dieser Studie untersucht wurden, sind weitere Studien notwendig, um die Ergebnisse zu validieren.

#### **4.7 Zusammenfassung**

Trotz der begrenzten Anzahl an untersuchten Fällen ergab die gemeinsame Evaluation der immunhistochemischen und molekularen Parameter in der Cluster-Analyse zwei verschiedene Gruppen mit signifikantem Unterschied im Invasions- und Rezidiv-Risiko. Außerdem deutet die Cluster-Analyse darauf hin, dass die Graduierungen PUNLMP und LG-PUC eng miteinander verbunden sind und wahrscheinlich teilweise ein gemeinsames tumorbiologisches Spektrum abdecken. Beide Entitäten haben den gleichen therapeutischen und klinischen Ansatz. Die Unterscheidung zwischen den beiden Entitäten PUNLMP und LG-PUC basiert derzeit auf der Beurteilung der histologischen Parameter, welche subjektiven Einflüssen in ihren Interpretationen unterliegen. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Patientenkohorte sind notwendig, um die Unterscheidung von PUNLMP und LG-PUC zu verbessern [108]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass multiparametrische Analysen von Protein- und Genmarkern für die Graduierung von nicht-muskelinvasiven Tumoren der Harnblase nützlich sein können. Außerdem könnte dadurch die Vorhersage für das klinische Verhalten sowie das Invasions-, und Rezidiv-Risiko verbessert werden.

## 5 Abkürzungen

ASI	= Altersstandardisierte Inzidenz
CIS	= Carcinoma in situ
MIBC	= muscle invasive bladder cancer
NMIBC	= non-muscle invasive bladder cancer
Tab.	= Tabelle
Abb.	= Abbildung
WHO	= World Health Organization
PUNLMP	= Papillary Urothelial neoplasm of low-malignant potential
LG-PUC	= low grade papillary urothelial carcinoma
HG-PUC	= high grade papillary urothelial carcinoma
MSCTU	= Mehrschicht-CT-Urographie
TUR-B	= transurethrale Resektion von Blasengewebe
p-HH3	= Phosphohistone H3
CK20	= Cytokeratin 20
FGFR3	= Fibroblast growth factor receptor 3
PTEN	= Phosphatase and tensin homolog
STAG2	= Stromal antigene 2
PIK3CA	= phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit Alpha
TP53	= tumor proteine 53
NGS	= next generation sequencing
RB1	= Retinoblastoma 1
PKB	= Proteinkinase B
CDK	= Cyclin-dependent kinases
TFIIH	= Transcription factor II Human
qPCR	= quantitative polymerase chain reaction
VAF	= variant allele frequency
PAM	= partitioning medoid

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018*. Eur J Cancer, 2018. **103**: p. 356-387.
2. Richters, A., K.K.H. Aben, and L. Kiemeny, *The global burden of urinary bladder cancer: an update*. World J Urol, 2020. **38**(8): p. 1895-1904.
3. Svatek, R.S., et al., *The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease*. Eur Urol, 2014. **66**(2): p. 253-62.
4. Huang, C.Y., et al., *Gender differences in trends of bladder cancer mortality-to-incidence ratios according to health expenditure in 55 countries*. PLoS One, 2021. **16**(2): p. e0244510.
5. Al-Zalabani, A.H., et al., *Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses*. Eur J Epidemiol, 2016. **31**(9): p. 811-51.
6. Letašiová, S., et al., *Bladder cancer, a review of the environmental risk factors*. Environmental Health, 2012. **11**(1): p. S11.
7. Knight, A., et al., *Urinary bladder cancer in Wegener's granulomatosis: risks and relation to cyclophosphamide*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(10): p. 1307-11.
8. Yan, H., et al., *Pioglitazone use in patients with diabetes and risk of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 1627-1638.
9. Aben, K.K., et al., *Familial aggregation of urothelial cell carcinoma*. Int J Cancer, 2002. **98**(2): p. 274-8.
10. Osman, Y., et al., *The value of frozen-section analysis of ureteric margins on surgical decision-making in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer*. BJU Int, 2007. **99**(1): p. 81-4.
11. Carson, C.C., 3rd, J.W. Segura, and L.F. Greene, *Clinical importance of microhematuria*. Jama, 1979. **241**(2): p. 149-50.
12. Cox, C.E., A.S. Cass, and W.H. Boyce, *Bladder cancer: a 26-year review*. J Urol, 1969. **101**(4): p. 550-8.
13. Shephard, E.A., et al., *Clinical features of bladder cancer in primary care*. Br J Gen Pract, 2012. **62**(602): p. e598-604.
14. Ahmadi, H., V. Duddalwar, and S. Daneshmand, *Diagnosis and Staging of Bladder Cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2021. **35**(3): p. 531-541.
15. Bialek, L., et al., *Bimanual palpation for staging of bladder cancer-clinical use and its predictors*. Turk J Urol, 2019. **45**(1): p. 22-26.
16. Kramer, M.W., et al., *Current Evidence of Transurethral En-bloc Resection of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer*. Eur Urol Focus, 2017. **3**(6): p. 567-576.
17. Kim, S.K., *Role of PET/CT in muscle-invasive bladder cancer*. Transl Androl Urol, 2020. **9**(6): p. 2908-2919.
18. Laukhtina, E., et al., *Diagnostic Accuracy of Novel Urinary Biomarker Tests in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Network Meta-analysis*. Eur Urol Oncol, 2021. **4**(6): p. 927-942.

19. Rathert, R., *Urinzytologie - Praxis und Atlas*. . Vol. 4. 2007: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
20. *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 315-22.
21. Remzi, M., Nader, A., *Leitlinie Urothelkarzinom des oberen Harntrakts*. J Urol. Urogynäkol. , 2010.
22. Rouprêt, M., et al., *European guidelines for the diagnosis and management of upper urinary tract urothelial cell carcinomas: 2011 update*. Eur Urol, 2011. **59**(4): p. 584-94.
23. Schmelz, S., Weidner, *Facharztwissen Urologie: Differenzierte Diagnostik und Therapie*. Vol. 2. 2010: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
24. Sadow, C.A., et al., *Positive predictive value of CT urography in the evaluation of upper tract urothelial cancer*. AJR Am J Roentgenol, 2010. **195**(5): p. W337-43.
25. van Rhijn, B.W., et al., *Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy*. Eur Urol, 2009. **56**(3): p. 430-42.
26. Kamat, A.M., et al., *Bladder cancer*. Lancet, 2016. **388**(10061): p. 2796-2810.
27. Moch, H., et al., *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours*. Eur Urol, 2016. **70**(1): p. 93-105.
28. Berdik, C., *Unlocking bladder cancer*. Nature, 2017. **551**(7679): p. S34-s35.
29. Humphrey, P.A., et al., *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours*. Eur Urol, 2016. **70**(1): p. 106-119.
30. Collà Ruvolo, C., et al., *Comparison between 1973 and 2004/2016 WHO grading systems in patients with Ta urothelial carcinoma of urinary bladder*. J Clin Pathol, 2022. **75**(5): p. 333-337.
31. Woldu, S.L., A. Bagrodia, and Y. Lotan, *Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer*. BJU Int, 2017. **119**(3): p. 371-380.
32. Pycha, A. and S. Palermo, *How to teach the teacher to teach the TUR-B*. Int J Surg, 2007. **5**(2): p. 81-5.
33. Kriegmair, M.C., et al., *Wide-field autofluorescence-guided TUR-B for the detection of bladder cancer: a pilot study*. World J Urol, 2018. **36**(5): p. 745-751.
34. Volpe, A., et al., *Mitomycin C for the treatment of bladder cancer*. Minerva Urol Nefrol, 2010. **62**(2): p. 133-44.
35. Han, J., et al., *Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect*. Biomed Pharmacother, 2020. **129**: p. 110393.
36. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms - Langfassung [Internet]*. 2020.
37. Pfister, C., et al., *Randomized Phase III Trial of Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin, or Gemcitabine and Cisplatin as Perioperative Chemotherapy for Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer. Analysis of the GETUG/AFU V05 VESPER Trial Secondary Endpoints:*

- Chemotherapy Toxicity and Pathological Responses*. Eur Urol, 2021. **79**(2): p. 214-221.
38. Balar, A.V., et al., *Pembrolizumab monotherapy for the treatment of high-risk non-muscle-invasive bladder cancer unresponsive to BCG (KEYNOTE-057): an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 study*. Lancet Oncol, 2021. **22**(7): p. 919-930.
  39. Tumor Zentrum Oberösterreich - Dr. F. Stoiber, D.J.B., Dr. M. Girschikofsky, Dr. C. Peither, Dr. R. Synak *Leitlinie Urothelkarzinome 2020*.
  40. Sylvester, R.J., et al., *Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials*. Eur Urol, 2006. **49**(3): p. 466-5; discussion 475-7.
  41. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 25-41.
  42. Hautmann, R.E., et al., *Cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: results of a surgery only series in the neobladder era*. J Urol, 2006. **176**(2): p. 486-92; discussion 491-2.
  43. Hernández-Fernández, C., et al., *Infiltrating bladder cancer: prognostic factors, follow-up and treatment of relapses*. Actas Urol Esp, 2017. **41**(6): p. 352-358.
  44. Isharwal, S. and B. Konety, *Non-muscle invasive bladder cancer risk stratification*. Indian J Urol, 2015. **31**(4): p. 289-96.
  45. van Rhijn, B.W., et al., *Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer*. Eur Urol, 2010. **58**(3): p. 433-41.
  46. Linskrog, S.V., et al., *An integrated multi-omics analysis identifies prognostic molecular subtypes of non-muscle-invasive bladder cancer*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 2301.
  47. Compérat, E.M., et al., *Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016"*. Eur Urol Focus, 2019. **5**(3): p. 457-466.
  48. Hedegaard, J., et al., *Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma*. Cancer Cell, 2016. **30**(1): p. 27-42.
  49. Sjö Dahl, G., et al., *A molecular taxonomy for urothelial carcinoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(12): p. 3377-86.
  50. Damrauer, J.S., et al., *Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3110-5.
  51. Tan, T.Z., et al., *Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors*. Eur Urol, 2019. **75**(3): p. 423-432.
  52. Shokeir, A.A., *Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment*. BJU Int, 2004. **93**(2): p. 216-20.
  53. Sjö Dahl, G., et al., *Different Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma Molecular Subtypes*. Eur Urol, 2022. **81**(5): p. 523-532.

54. Jones, P.A. and M.J. Droller, *Pathways of development and progression in bladder cancer: new correlations between clinical observations and molecular mechanisms*. *Semin Urol*, 1993. **11**(4): p. 177-92.
  55. Hosen, I., et al., *Mutations in TERT promoter and FGFR3 and telomere length in bladder cancer*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(7): p. 1621-9.
  56. Meeks, J.J., et al., *Genomic characterization of high-risk non-muscle invasive bladder cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(46): p. 75176-75184.
  57. Solomon, D.A., et al., *Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer*. *Nat Genet*, 2013. **45**(12): p. 1428-30.
  58. Morrison, C.D., et al., *Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(6): p. E672-81.
  59. Shariat, S.F., et al., *p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(6): p. 1014-24.
  60. Hurst, C.D., et al., *Genomic Subtypes of Non-invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in KDM6A Mutation Frequency*. *Cancer Cell*, 2017. **32**(5): p. 701-715.e7.
  61. Wang, Y., et al., *Advances in research on and diagnosis and treatment of achondroplasia in China*. *Intractable Rare Dis Res*, 2013. **2**(2): p. 45-50.
  62. Foldynova-Trantirkova, S., W.R. Wilcox, and P. Krejci, *Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in skeletal dysplasias*. *Hum Mutat*, 2012. **33**(1): p. 29-41.
  63. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(5): p. 401-4.
  64. Shi, M.J., et al., *APOBEC-mediated Mutagenesis as a Likely Cause of FGFR3 S249C Mutation Over-representation in Bladder Cancer*. *Eur Urol*, 2019. **76**(1): p. 9-13.
  65. Minoli, M., et al., *Evolution of Urothelial Bladder Cancer in the Context of Molecular Classifications*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(16).
  66. Kacew, A. and R.F. Sweis, *FGFR3 Alterations in the Era of Immunotherapy for Urothelial Bladder Cancer*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 575258.
  67. Madsen, R.R., B. Vanhaesebroeck, and R.K. Semple, *Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders*. *Trends Mol Med*, 2018. **24**(10): p. 856-870.
  68. Mirzaa, G., J.M. Graham, Jr., and K. Keppler-Noreuil, *PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle
- Copyright © 1993-2023, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
69. Leslie, N.R., et al., *The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation*. *Biochem Soc Trans*, 2016. **44**(1): p. 273-8.
  70. Pilarski, R., *PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: A Clinical Overview*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(6).

71. Mehta, G.D., et al., *Cohesin: functions beyond sister chromatid cohesion*. FEBS Lett, 2013. **587**(15): p. 2299-312.
72. Gordon, N.S., et al., *STAG2 Protein Expression in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: Associations with Sex, Genomic and Transcriptomic Changes, and Clinical Outcomes*. Eur Urol Open Sci, 2022. **38**: p. 88-95.
73. Sabapathy, K. and D.P. Lane, *Understanding p53 functions through p53 antibodies*. J Mol Cell Biol, 2019. **11**(4): p. 317-329.
74. Hyun, S.Y. and Y.J. Jang, *p53 activates G<sub>1</sub> checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest*. Oncotarget, 2015. **6**(7): p. 4804-15.
75. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
76. Li, Q., et al., *ERCC2 Helicase Domain Mutations Confer Nucleotide Excision Repair Deficiency and Drive Cisplatin Sensitivity in Muscle-Invasive Bladder Cancer*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(3): p. 977-988.
77. Iyer, N., et al., *Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein*. Biochemistry, 1996. **35**(7): p. 2157-67.
78. Xiao, F., et al., *Association between the ERCC2 Asp312Asn polymorphism and risk of cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(29): p. 48488-48506.
79. Geelvink, M., et al., *Diagnostic and Prognostic Implications of FGFR3(high)/Ki67(high) Papillary Bladder Cancers*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
80. Shin, Y., et al., *PHH3 as an Ancillary Mitotic Marker in Gastrointestinal Stromal Tumors*. J Pathol Transl Med, 2015. **49**(1): p. 23-9.
81. Moll, R., et al., *The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas*. Differentiation, 1993. **53**(2): p. 75-93.
82. Gandhi, M.J., et al., *Targeted Next-Generation Sequencing for Human Leukocyte Antigen Typing in a Clinical Laboratory: Metrics of Relevance and Considerations for Its Successful Implementation*. Arch Pathol Lab Med, 2017. **141**(6): p. 806-812.
83. Pourebrahimi, E., et al., *The value of BCL2 and CK20 expression in predicting behavioral patterns of bladder cancer, a cross sectional study*. Ann Med Surg (Lond), 2022. **81**: p. 104372.
84. Sridhar, J., N. Akula, and N. Pattabiraman, *Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors*. Aaps j, 2006. **8**(1): p. E204-21.
85. De Wispelaere, N., et al., *High prevalence of p16 staining in malignant tumors*. PLoS One, 2022. **17**(7): p. e0262877.
86. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-4.
87. McDonough, S.J., et al., *Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods*. PLoS One, 2019. **14**(4): p. e0211400.
88. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.

89. Ponchel, F., et al., *Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions*. BMC Biotechnol, 2003. **3**: p. 18.
90. Montes-Mojarro, I.A., et al., *Multiparametric Classification of Non-Muscle Invasive Papillary Urothelial Neoplasms: Combining Morphological, Phenotypical, and Molecular Features for Improved Risk Stratification*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(15).
91. Kvikstad, V., et al., *Prognostic value and reproducibility of different microscopic characteristics in the WHO grading systems for pTa and pT1 urinary bladder urothelial carcinomas*. Diagn Pathol, 2019. **14**(1): p. 90.
92. Jaworski, D., et al., *Diagnostic difficulties in cases of papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, urothelial proliferation of uncertain malignant potential, urothelial dysplasia and urothelial papilloma: A review of current literature*. Ann Diagn Pathol, 2019. **40**: p. 182-188.
93. MacLennan, G.T., Z. Kirkali, and L. Cheng, *Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms*. Eur Urol, 2007. **51**(4): p. 889-97; discussion 897-8.
94. Hentschel, A.E., et al., *Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUN-LMP): Still a meaningful histo-pathological grade category for Ta, noninvasive bladder tumors in 2019?* Urol Oncol, 2020. **38**(5): p. 440-448.
95. Jones, T.D. and L. Cheng, *Reappraisal of the papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP)*. Histopathology, 2020. **77**(4): p. 525-535.
96. Kim, J.K., et al., *Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential (PUNLMP) After Initial TUR-BT: Comparative Analyses with Noninvasive Low-Grade Papillary Urothelial Carcinoma (LGPUC)*. J Cancer, 2017. **8**(15): p. 2885-2891.
97. Ibrahim, A., et al., *Assessment of mitotic activity in breast cancer: revisited in the digital pathology era*. J Clin Pathol, 2022. **75**(6): p. 365-372.
98. Quintero, A., et al., *Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder*. J Clin Pathol, 2006. **59**(1): p. 83-8.
99. Mallofré, C., et al., *Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia*. Mod Pathol, 2003. **16**(3): p. 187-91.
100. Akhtar, M., et al., *CK20 and CK5/6 Immunohistochemical Staining of Urothelial Neoplasms: A Perspective*. Adv Urol, 2020. **2020**: p. 4920236.
101. Arias-Stella, J.A., 3rd, et al., *CK20 and p53 Immunohistochemical Staining Patterns in Urinary Bladder Specimens With Equivocal Atypia*. Arch Pathol Lab Med, 2018. **142**(1): p. 64-69.
102. Billerey, C., et al., *Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 1955-9.
103. di Martino, E., et al., *Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type- and mutation-specific manner*. Oncogene, 2009. **28**(48): p. 4306-16.

104. Lindgren, D., et al., *Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome*. *Cancer Res*, 2010. **70**(9): p. 3463-72.
105. Kamoun, A., et al., *A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer*. *Eur Urol*, 2020. **77**(4): p. 420-433.
106. Liu, D., et al., *Clinical Validation of Chemotherapy Response Biomarker ERCC2 in Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma*. *JAMA Oncol*, 2016. **2**(8): p. 1094-6.
107. Van Allen, E.M., et al., *Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(10): p. 1140-53.
108. Chang, S.S., et al., *Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline*. *J Urol*, 2016. **196**(4): p. 1021-9.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeiten, die in diesem Artikel beschrieben werden, entstanden im Rahmen der Tätigkeiten im Graduiertenkolleg 2543/1 „Intraoperative Multisensorische Gewebedifferenzierung in der Onkologie" Teilprojekt C3, gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Diese Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Falko Fend durchgeführt. Der Großteil der Arbeit wurde in der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie des Departments für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Fallsuche wurde von mir mit Unterstützung durch Frau Ivonne A. Montes-Mojarro durchgeführt. Die potenziellen Fälle stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie Tübingen. Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden vom medizinisch-technischen Personal der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie angefertigt und von mir unter Supervision von Frau Ivonne A. Montes und Herrn Prof. Dr. Falko Fend ausgewertet. Die Auswertung der Mutationsanalysen wurden von mir unter Supervision von Frau Dr. Irina Bonzheim und Herr Dr. Philip Sander durchgeführt. Die Bedienung des Ion ChefTM und des Ion Torrent PGMTM Instruments wurde dabei von Frau Franziska Mihalik, Frau Rebecca Braun und Frau Isabell Haußmann übernommen. Die statistische Auswertung wurde mit der Unterstützung von Frau Lina M. S. Higueta, vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie, durchgeführt. Die zugehörige Originalpublikation wurde in Zusammenarbeit mit Frau Ivonne A. Montes-Mojarro, Herrn Prof. Dr. Falko Fend verfasst und von allen Koautoren überarbeitet. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## 8 Veröffentlichungen

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits in folgender Publikation publiziert:

“Multiparametric classification of non-muscle invasive-papillary urothelial neoplasms: combining morphological, phenotypical and molecular features for improved risk stratification” Montes-Mojarro I, Hassas S, Staehle S, Sander P, Harland N, Serna-Higueta L, Bösmüller H, Stenzl A, Fend F; International Journal of Molecular Sciences

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen und mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Falko Fend, der mir die Promotion am Institut für Pathologie ermöglicht und mich dabei über mehrere Jahre intensiv betreut hat. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Ivonne A. Montes Mojarro, die bei jeglichen Fragen stets zur Seite stand. Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Hans Bösmüller bei der Unterstützung der Fallauswertungen. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Herr Dr. Philip Sander und Frau Dr. Irina Bonzheim, für die Unterstützung bei fachlichen Fragen und für die exzellente Einarbeitung. Ganz herzlich möchte ich außerdem Frau Sema Colak, Frau Franziska Mihalik, Frau Rebecca Braun und Frau Isabell Haußmann für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt auch Frau Lina M. S. Higueta bei der Unterstützung der statistischen Auswertungen. Darüber hinaus möchte ich Ivonne Montes-Mojarro, und allen Doktoranden der Arbeitsgruppe für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre und moralische Unterstützung danken.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums und der Promotionsarbeit unterstützt haben.