

Aus der Urologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel

Lymphangiogenese- und Proliferationsmarker:
Assoziation mit histopathologischen Merkmalen und Krankheitsverlauf
beim Harnblasenkarzinom nach radikaler Zystektomie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Jakob Heinkele
aus
Freiburg im Breisgau
2019

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Herr Priv. Doz. Dr. med. Philipp Erben

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 Urothelkarzinom der Harnblase.....	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Risikofaktoren.....	7
1.1.3 Tumorgenese	8
1.1.4 Symptomatik, Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms ...	8
1.1.5 Prognose und Prognoseabschätzung	10
1.2 Beschreibung der untersuchten Biomarker	12
1.2.1 Proliferationsmarker (MKI67/RACGAP1)	12
1.2.2 Lymphangiogenesemarker (VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3).....	13
1.3 Ziel der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Patientenkohorte	15
2.2 Probengewinnung	16
2.3 RNA-Expressionsanalyse.....	17
2.3.1 RNA-Extraktion aus FFPE-Tumorgewebe.....	17
2.3.2 Reverse Transkription von FFPE-RNA (SSIIIRT) und Zelllinien RNA (M-MLV RT).....	18
2.3.3 Quantitative PCR	20
2.3.4 Primeretablierung (Detektionslimits, Effizienz).....	22
2.3.5 Quantifizierung von qPCR Daten	23
2.4 Statistische Auswertung der Daten	24
3 ERGEBNISSE	25
3.1 Primeretablierung an Zelllinien cDNA	25
3.2 Klinische Daten der Patientenkohorte und <i>Follow-Up</i>	26
3.3 Auswertung der Markerexpression am Patientenkollektiv.....	28

3.3.1	Deskriptive Übersicht der Markerexpression	28
3.3.2	Coexpression der untersuchten Gene	30
3.3.3	Genexpression in Bezug auf histopathologische Parameter	31
3.4	Prognostische Relevanz demographischer und klinisch-pathologischer Eigenschaften.....	38
3.4.1	Uni- und Multivariate Analyse: Rezidivfreies Überleben.....	38
3.4.2	Uni- und Multivariate Analyse: Krankheitsspezifisches Überleben...	39
3.4.3	Uni- und Multivariate Analyse: Gesamtüberleben	40
3.4.4	Marker-Kombination	42
4	DISKUSSION.....	43
4.1	Lymphangiogenesemarker.....	43
4.2	Proliferationsmarker	47
4.3	Methodik und Limitationen	49
4.4	Schlussfolgerung	50
5	ZUSAMMENFASSUNG	52
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	53
7	ANHANG	67
7.1	Materialliste	67
7.2	Primer, Sonden und Genprodukte.....	68
7.3	Fragebogen für niedergelassene Hausärzte und Urologen	70
8	LEBENS LAUF	71
9	DANKSAGUNGEN	72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASR	Altersstandardisierte Inzidenz
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
Calm	Calmodulin
CIS	Carcinoma in situ
CT-Wert	Cycle Threshold Wert
DSS	Krankheitsspezifisches Überleben
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FFPE	Fresh Frozen Paraffin Embedded
FGFR-3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
HE	Hämatoxilin-Eosin
Her2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HR	Hazard Ratio
IHC	Immunhistochemie
IQR	Interquartile Range
ITLVD	Intratumorale Lymphgefäßdichte
Ki67	Synonym zu MKI67
LVI	Lymphgefäßinvasion
MIBC	Muskelinvasives Harnblasenkarzinom
MKI67	Marker of Proliferation Ki67
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin Kinase
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NMIBC	Nicht-Muskelinvasives Harnblasenkarzinom
OS	Gesamtüberleben
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Gene
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RACGAP1	Rac GTPase Activating Protein 1
Rac1	Rac Family Small GTPase 1
RFS	Rezidivfreies Überleben
RNase	Ribonuklease

RPL37A	Ribosomal Protein L37a
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RZE	Radikale Zystektomie
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

1 EINLEITUNG

1.1 Urothelkarzinom der Harnblase

1.1.1 Epidemiologie

Das invasive Harnblasenkarzinom ($\geq T1$) stellt in Deutschland die vierthäufigste Krebserkrankung des Mannes und die vierzehnthäufigste Krebserkrankung der Frau dar. Die Inzidenz im Jahr 2014 betrug in Deutschland ca. 15.800 Fälle, wobei Männer fast dreimal so häufig erkrankten wie Frauen. Darüber hinaus kam es zu rund 13.700 Fällen von nicht invasiven papillären Karzinomen (Ta) sowie Carcinomata in situ (Tis). Die Mortalität des Harnblasenkarzinoms belief sich in Deutschland im Jahr 2014 auf rund 5700. Von allen Krebssterbefällen ist das Harnblasenkarzinom bei Männern die zehnthäufigste, bei Frauen die fünfzehnthäufigste Todesursache (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2017).

Weltweit betrachtet ist das Harnblasenkarzinom der neunthäufigste Tumor bezogen auf die jährlichen Tumorneuerkrankungen (Ploeg et al., 2009). Die altersstandardisierte Inzidenz (ASR) variiert weltweit signifikant zwischen Regionen und Ländern. Besonders hoch ist die ASR in höher entwickelten Ländern. In Entwicklungsländern liegt sie um ein Vielfaches niedriger (Antoni et al., 2017). Dies lässt sich durch auf Unterschiede in der Exposition gegenüber Risikofaktoren erklären. Die bedeutendsten Risikofaktoren sind Tabakrauchen und die berufliche Exposition zu Karzinogenen. In Entwicklungsländern wird die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms vor allem durch eine Zunahme des Tabakkonsums voraussichtlich zunehmen. In heutigen Industrieländern wird die Inzidenz des Blasenkarzinoms hingegen vermutlich sinken, da der Tabakkonsum seit Jahren rückläufig ist und die berufliche Exposition zu Karzinogenen durch Arbeitsschutzmaßnahmen minimiert wird (Ploeg et al., 2009). Von der Tumorgesamtheit der Harnblasenkarzinome machen Urothelkarzinome die Mehrheit von ca. 95% aus, weniger als 3% machen Plattenepithelkarzinome, weniger als 2% Adenokarzinome aus (Kantor et al., 1988).

Zum Zeitpunkt der Diagnose zeigen 75% der Patienten ein nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom (NMIBC), während ca. 25% der Patienten bereits ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom (MIBC) aufweisen. Etwa 50% der NMIBC zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose einen niedrigen Malignitätsgrad (low-grade), während die

meisten muskelinvasiven Formen einen hohen Malignitätsgrad (high-grade) aufweisen.

1.1.2 Risikofaktoren

Die Neuerkrankungsrate des Harnblasenkarzinoms nimmt in Deutschland mit steigendem Lebensalter kontinuierlich zu, ohne dass es zu einer Abflachung der Neuerkrankungsrate im hohen Alter kommt (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2017). Frauen weisen zwar ein geringeres Erkrankungsrisiko als Männer auf, haben im Fall der Erkrankung jedoch eine schlechtere Prognose als Männer (Otto et al., 2012). Daneben gibt es weitere spezifische Risikofaktoren, die einen Einfluss auf die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms haben. Tabakrauchen ist der am besten untersuchte und stärkste Risikofaktor für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms und ist verantwortlich für über 50% der Fälle bei Männern und über 20% der Fälle bei Frauen (Freedman et al., 2011). Die regelmäßige Exposition zu kanzerogenen Chemikalien am Arbeitsplatz ist ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms. Insbesondere zu nennen sind hier aromatische Amine. Diese sind für bis zu 25% der Harnblasenkarzinome verantwortlich. Betroffen sind besonders Personen, die beruflich einer hohen Exposition mit Farben, Lacken, Gummi, Textilien und Leder ausgesetzt sind (Pashos and Botteman, 2002). Des Weiteren können Harnblasenkarzinome durch die Behandlung mit Arzneistoffen ausgelöst werden. Der bekannteste Vertreter ist hierbei Cyclophosphamid (Fairchild et al., 1979). Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms sind vorherige Bestrahlungen im kleinen Becken zum Beispiel im Rahmen der Behandlung eines Prostatakarzinoms oder gynäkologischer Tumoren (Chrouser et al., 2005). Darüber hinaus gibt es zunehmende Evidenz, dass auch genetische Faktoren eine Rolle in der Ätiologie des Harnblasenkarzinoms spielen. So haben Personen mit Verwandten ersten Grades, die an einem Harnblasenkarzinom erkrankt sind, ein höheres Risiko für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms (Murta-Nascimento et al., 2007). Genetische Veränderungen, die hierbei eine Rolle spielen, sind beispielsweise Polymorphismen in Genen, die zur Verstoffwechslung und Entgiftung von Karzinogenen beitragen. Dazu zählen insbesondere die N-Acetyltransferase-2, Glutathion-S-Transferase M1, UDP-Glucuronyltransferase-1-A-6 (Garcia-Closas et al., 2014).

1.1.3 Tumorgenese

Das Urothelkarzinom der Harnblase zeigt ein heterogenes Verhalten. Das *low-grade* nicht-muskelinvasive und das *high-grade* invasive Urothelkarzinom können genetisch und klinisch als nahezu distinkte Entitäten bezeichnet werden. Es existieren mindestens zwei Wege entlang derer sich das Urothelkarzinom entwickelt. Dieses Zwei-Wege-Modell vereint in sich histopathologische sowie molekulare Eigenschaften der beiden Subtypen.

Die erste Gruppe beinhaltet *low-grade*, oft papilläre Tumore (pTa und pT1), welche für über 70% der Urothelkarzinome verantwortlich sind. Sie sind genetisch stabil und weisen in der Regel einen diploiden Karyotyp auf (Knowles and Hurst, 2015). Hier liegen meist *Gain of Function* Mutationen in Onkogenen wie dem H-RAS Protoonkogen, dem *Fibroblast Growth Factor Receptor 3* (FGFR-3) und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) vor. Des Weiteren kommt es oft zu einer Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q). Diese Tumore entwickeln sich von einer Hyperplasie des Epithels zu einem papillären meist nicht-invasiven Tumor. Zu dieser ersten Gruppe zählt jedoch auch ein Anteil von *high-grade* Tumoren, die einen Progress zur invasiven Form durchlaufen können.

Die zweite Gruppe beinhaltet die muskelinvasiven *high-grade* Tumore, sowie flache *high-grade* Tumore, sogenannte Carcinomata in situ (CIS), welche als Vorläufer der invasiven Karzinome gelten. Die Tumore dieser Gruppe haben häufig einen instabilen aneuploiden Karyotyp einschließlich Chromotrypsis (Morrison et al., 2014). Hier liegen vor allem *Loss of Function* Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p53, Retinoblastomgen sowie *Phosphatase and Tensin Homolog Gene* (PTEN) vor. Sie können sich direkt zur invasiven Form entwickeln ohne zuvor eine papilläre Zwischenstufe gebildet zu haben (Ho et al., 2012). Mittlerweile wurden zahlreiche weitere genetische, sowie epigenetische Alterationen ermittelt, die zur Entstehung des Blasenkarzinoms beitragen (Knowles and Hurst, 2015).

1.1.4 Symptomatik, Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms

Das Hauptsymptom zum Zeitpunkt der Diagnose eines Harnblasenkarzinoms stellt die schmerzlose Makrohämaturie dar. Weitere typische Symptome sind: Dysurie, Drang-Symptomatik oder eine erhöhte Harnfrequenz. In fortgeschrittenen Tumorstadien kann es zu obstruktiven Miktionsbeschwerden oder einem Harnverhalt kommen. Außerdem

kann es zu Abflussstörungen im oberen Harntrakt mit der Ausbildung von Hydronephrosen kommen. Schmerzen treten beim Harnblasenkarzinom erst in fortgeschrittenen Tumorstadien auf. Die körperliche Untersuchung spielt beim MIBC nur eine untergeordnete Rolle. Die bimanuelle Untersuchung in Narkose dient zur Feststellung einer pathologischen Fixierung der Blase im kleinen Becken bei wandüberschreitendem Tumorwachstum (Wijkström et al., 1998). Die Urinzytologie dient mit hoher Spezifität insbesondere dem Nachweis von *high-grade* Blasentumoren (Raitanen et al., 2002). Dem klinischen Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom folgt eine Zystoskopie, im Rahmen derer die histologische Sicherung durch eine transurethrale Resektion der Harnblase (TUR-B) durchgeführt wird. Hierbei wird der Tumor nach Möglichkeit vollständig und *en bloc* reseziert. Das resezierte Material sollte die Schicht des Musculus detrusor vesicae enthalten, damit eine Muskelinvasion detektiert werden kann. Die Resektionsränder sollten erkennbar im gesunden Urothel liegen. Ziel der TUR-B ist die präzise Diagnose und histopathologische Untersuchung einschließlich der Stadieneinteilung (Sobin et al., 2009). Kann im TUR-B Resektat keine Muskelinvasion nachgewiesen werden, ist das weitere Vorgehen abhängig von der Risikostratifizierung des Tumors in *low-risk*, *intermediate-risk* und *high-risk* (Sylvester et al., 2006). Dieses beinhaltet die postoperative Chemotherapie-Frühinstillation, Instillationen mit Bacille-Calmette-Guerin, Nachresektionen sowie eine regelmäßige Nachsorge (Babjuk et al., 2013).

Falls hingegen eine Muskelinvasion nachgewiesen werden kann, soll zur Ausbreitungsdiagnostik eine Schnittbildgebung mit Kontrastmittel Thorax bis Becken einschließlich einer Urographie erfolgen (Molen et al., 2008). Für das muskelinvasive nicht-metastasierte Urothelkarzinom ist die radikale Zystektomie (RZE) einschließlich bilateraler pelviner Lymphadenektomie die kurative Behandlungsmethode der Wahl (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF), 2016). Verbunden damit ist beim Mann zusätzlich die Entfernung der Prostata, bei der Frau die Entfernung von Uterus, Adnexen und vorderer Vaginalwand. Die Indikation zur radikalen Zystektomie auch beim nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom ist bei folgenden Konstellationen zu erwägen: Multifokaler oder großer pT1/*high-grade*/G3 Tumor im TUR-B Präparat, ein begleitendes Cis bei pT1/*high-grade*/G3 Tumor oder ein Rezidiv eines pT1/*high-grade*/G3 Tumors trotz Instillationstherapie (Babjuk et al., 2013). Die radikale Zystektomie sollte innerhalb von drei Monaten nach Diagnosestellung erfolgen (Nielsen et al., 2007). Eine neoadjuvante Cisplatin basierte

Chemotherapie kann beim lokalisierten muskelinvasiven Urothelkarzinom unabhängig vom Lymphknotenstatus durchgeführt werden (Meeks et al., 2012).

Bei Patienten mit einem organüberschreitenden, muskelinvasiven Urothelkarzinom (\geq pT3) und/oder positiven Lymphknotenstatus sollte eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, falls zuvor keine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt wurde. Diese sollte ebenfalls Cisplatin basiert sein. Häufige Schemata sind hier GC (Gemcitabin und Cisplatin) oder MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) (Von Der Maase et al., 2005). In der metastasierten Situation werden seit mehreren Jahrzehnten auf Cisplatin basierende Chemotherapieschemata eingesetzt (Bellmunt and Petrylak, 2012). In der Zweitlinientherapie hat sich Vinflunin etabliert (Culine et al., 2006). Als bisher einzige Form der zielgerichteten Therapie hat sich die Immuntherapie mit Checkpointinhibitoren wie Pembrolizumab oder Atezolizumab etabliert (Bellmunt et al., 2017; Rosenberg et al., 2016).

1.1.5 Prognose und Prognoseabschätzung

Das NMIBC rezidiert nach der Therapie häufig, zu einem Progress in die invasive Form kommt es in der Mehrheit der Fälle jedoch nicht. Über einen 5-Jahres Zeitraum nach Therapie kommt es beim NMIBC in 50%-70% der Fälle zum Rezidiv, aber nur in 10%-30% zu einer Progression (Kamat et al., 2016).

Das MIBC Urothelkarzinom ist deutlich aggressiver und mit einer hohen Mortalität verbunden. Unbehandelt überleben weniger als 15% der Patienten länger als zwei Jahre (Prout and Marshall, 1956). In einer Zystektomiekohorte (ausschließlich Zystektomie, keine neo- oder adjuvanten Therapien) mit 1100 Patienten ergaben sich über einen Zeitraum von zehn Jahren folgende Überlebensdaten: Rezidivfreies Überleben 65,5%, krankheitsspezifisches Überleben 66,8% und Gesamtüberleben 44,3%. Betrachtet man ausschließlich Patienten ohne Lymphknotenmetastasen ist das krankheitsspezifische Überleben der Patienten mit nicht-muskelinvasiven Formen am höchsten mit 91%. PT2 und pT3 Tumore haben ein krankheitsspezifisches Überleben von 67% bzw. 60%. Mit einem krankheitsspezifischen Überleben von 36,6% haben pT4 Tumore eine deutlich schlechtere Prognose. Patienten mit Lymphknotenmetastasen haben die schlechteste Prognose mit einem krankheitsspezifischen Überleben von 16,7% über zehn Jahre (Hautmann et al., 2012). Lymphgefäßinvasion (LVI), die den ersten Schritt

der lymphogenen Mikrometastasierung darstellt, ist ebenfalls als eigenständiger Risikofaktor für ein Rezidiv und reduziertes Überleben anerkannt (Bolenz et al., 2010). So beläuft sich beim Vorliegen einer LVI das krankheitspezifische Überleben (zehn Jahre) auf 31,0% gegenüber 73,5% ohne LVI (Stein et al., 2001). Das lokal fortgeschrittene bzw. metastasierte Urothelkarzinom hat trotz (adjuvanter) Chemotherapie eine schlechte Prognose mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von ca. 15% (Von Der Maase et al., 2005).

Histopathologische Marker wie T-Stadium, N-Status und LVI stellen derzeit die wichtigsten Faktoren zu Prognoseabschätzung nach radikaler Zystektomie dar. Dennoch sind sie in ihrer Vorhersagekraft limitiert, da Patienten mit gleichem Stadium große Unterschiede in der Prognose haben können (Lotan et al., 2005; Shariat et al., 2006). Daher werden in zahlreichen Studien molekulare Marker untersucht, die die Vorhersagegenauigkeit für die Entwicklung eines Rezidivs und für die Überlebenszeit nach radikaler Zystektomie verbessern können (Bolenz and Lotan, 2008). Viele dieser Studien bedienen sich immunhistochemischer Analysen zur Bestimmung der Genexpression. Mittlerweile haben mehrere Arbeitsgruppen mittels genomweiter RNA-Expressionsanalytik gezeigt, dass eine weitere Subtypisierung des invasiven Harnblasenkarzinoms in mindestens einen luminalen und basalen Typ möglich ist (Choi et al., 2014; Damrauer et al., 2014; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass der luminale gegenüber dem basalen Subtyp mit einer besseren Prognose assoziiert ist. Außerdem unterscheiden sich die Subtypen im Ansprechen auf systemische Therapien. Interessanterweise weisen die Subtypen des Harnblasenkarzinoms Ähnlichkeit zu den Subtypen des Mammakarzinoms auf. Die Expression von unter anderem *Human epidermal growth factor receptor 2* (Her2) oder Hormonrezeptoren im Harnblasenkarzinom wirft die Frage auf, ob Patienten von gezielten Therapieoptionen profitieren könnten (Wirtz et al., 2016). Aufgrund noch nicht ausreichender prospektiver Validierung, Standardisierung und multizentrischer Studien ist die molekulare Subtypisierung in der klinischen Routine bislang nicht implementiert (Amin et al., 2014; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF), 2016).

1.2 Beschreibung der untersuchten Biomarker

1.2.1 Proliferationsmarker (MKI67/RACGAP1)

Hohes *Grading* und damit einhergehende hohe Proliferation sind typische Merkmale aggressiven Tumorverhaltens (Scholzen and Gerdes, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proliferationsmarker *Marker of Proliferation Ki67* (MKI67, Ki67) und *Rac GTPase-Activating Protein 1* (RACGAP1) auf mRNA-Ebene untersucht.

Das Protein Ki67 ist einer der am häufigsten verwendeten Marker zur Messung zellulärer Proliferation. Ki67 zeichnet sich dadurch aus, dass es im Zellkern proliferierender Zellen (G1-, S-, G2-, M-Phase) nachweisbar ist, während es in Zellen, die sich im Zellzyklusarrest (G0-Phase) befinden, nicht nachweisbar ist (Gerdes et al., 1984). Während der Interphase ist das Protein hauptsächlich im Kortex des Nukleolus vorhanden. Während der Mitose lagert sich das Protein an die kondensierten Chromosomen an. Die eigentliche Funktion von Ki67 im Zellteilungsprozess ist nicht ganz geklärt. Studien weisen jedoch darauf hin, dass es eine Rolle in der Polymerase-I-abhängigen rRNA-Synthese spielt (Bullwinkel et al., 2006). Eine Überexpression ist in vielen malignen Tumorentitäten zu beobachten und korreliert häufig mit einer schlechteren Prognose, unter anderem auch im Prostata- und Mammakarzinom (Bubendorf et al., 1996; Yerushalmi et al., 2010).

RACGAP1 ist ein Schlüsselprotein in der Kontrolle verschiedener zellulärer Prozesse. Es gehört zur Familie der *Rho GTPase-activating proteins* (Imaoka et al., 2014). Es dient zusammen mit Rac1 (*Rac Family Small GTPase 1*) als Mediator der Phosphorylierung von Proteinen der STAT-Familie (*Signal transducer and activator of transcription*) sowie als deren *Nuclear localising signal* (Kawashima et al., 2009). Des Weiteren ist RACGAP1 Teil des Proteinkomplexes Centralspindlin, welcher essentiell für die Induktion der Cytokinese im Rahmen der Mitose ist (Zhao and Fang, 2005). Der Knock-out von RACGAP1 in präklinischen Zellkulturmodellen verschiedener Tumorentitäten führte zu einer verminderten Proliferation, Migration und Invasion der Zellen (Imaoka et al., 2014; Wang et al., 2011). In malignen Tumoren spielt RACGAP1 zusätzlich zur Proliferation eine Rolle in der Metastasierung durch die Ausbildung von Pseudopodien (Jacquemet et al., 2013).

1.2.2 Lymphangiogenesemarker (VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3)

Tumorassoziierte Lymphangiogenese und eine erhöhte intratumorale Lymphgefäßdichte werden dafür verantwortlich gemacht, das Risiko der Streuung von Tumorzellen in benachbarte Lymphknoten und darüber hinaus zu erhöhen. Die Induktion der Lymphangiogenese wird durch zahlreiche lymphangiogenetische Wachstumsfaktoren und Cytokine unterstützt. Diese werden teils vom Tumor selbst, teils von Stromazellen oder auch tumorassoziierten Makrophagen synthetisiert und freigesetzt (Sleeman and Thiele, 2009).

Die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Faktoren sind Proteine aus der Familie der *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF). Insbesondere den Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D sowie deren Rezeptor VEGFR-3 wird eine ausschlaggebende Rolle bei der Lymphangiogenese zugeschrieben (Tammela et al., 2005). Die durch die Bindung von VEGF-C und VEGF-D ausgelöste Autophosphorylierung von VEGFR-3 resultiert in einer Aktivierung der Signalmoleküle ERK1/2 (*Extracellular Signal Regulated Kinase*) und des p13K/AKT/mTOR Signalwegs (Salameh et al., 2005). Dieser Signalweg kontrolliert die spezifischen Schritte, die zur Ausbildung von neuen Lymphgefäßen notwendig sind, wie die Proliferation von Lymphgefäßendothelzellen und die Ausbildung tubulärer Strukturen (Achen et al., 2005). Untermauert werden diese Aussagen durch Untersuchungen unterschiedlicher Tumorentitäten in präklinischen Tiermodellen, in denen nachgewiesen wurde, dass die Expression von VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 Lymphangiogenese und lymphogene Metastasierung begünstigt (Saharinen et al., 2004). Daten aus mehreren Biomarkerstudien verschiedener Tumorentitäten zeigen, dass die Expression von VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 mit dem Auftreten von Lymphgefäßinvasion und Lymphknotenmetastasen korreliert (Stacker et al., 2002). Beim Adenokarzinom des Magens konnte beispielsweise für die Faktoren VEGF-D und VEGFR-3 mittels immunhistochemischer Färbungen eine hochsignifikante Korrelation mit lymphogener Metastasierung und niedrigerem Überleben nachgewiesen werden. Auch beim Brustkrebs fanden Wissenschaftler eine starke positive Korrelation zwischen VEGF-C mRNA-Überexpression und reduziertem Überleben (Linardou et al., 2012). Es existieren jedoch auch Studien, die gegenteilige Korrelationen herausfanden (Mylona et al., 2006; Niki et al., 2000; O-Charoenrat et al., 2001). Beim Harnblasenkarzinom fanden Hardenberg et al. auf immunhistochemischer Basis eine Assoziation zwischen sowohl der VEGF-D als auch der VEGFR-3-Überexpression und reduziertem krankheitsspezifischem Überleben in der univariaten Analyse. In

der Subgruppe der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen war VEGFR-3-Überexpression ein unabhängiger Prädiktor für kürzeres rezidivfreies und krankheitsspezifisches Überleben (Hardenberg et al., 2014). Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls immunhistochemisch eine Assoziation von VEGF-D und VEGFR-3-Überexpression mit aggressiven Tumorcharakteristika und reduziertem rezidivfreiem Überleben an einer Zystektomiekohorte finden (Herrmann et al., 2007). Neben dem prognostischen Nutzen der Proteine des VEGF/VEGFR Systems könnten sie auch als therapeutisches Ziel dienen. So könnte zum Beispiel VEGFR-3 durch Tyrosinkinaseinhibitoren blockiert werden (Zhou et al., 2017).

1.3 Ziel der Arbeit

Das muskelinvasive Urothelkarzinom der Harnblase ist vor allem bei organüberschreitendem Wachstum und lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung zum Zeitpunkt der Zystektomie mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Eine lymphogene Mikrometastasierung, wie sie histopathologisch durch eine Lymphgefäßinvasion festgestellt werden kann, ist auch bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen mit einer höheren Rezidivrate verbunden. Lymphangiogenetische Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind an der Metastasierungskaskade beteiligt. Neben den Erkenntnissen zur Tumorbio­logie können diese potentiellen Biomarker therapeutische Zielstrukturen sein und dabei die Risikostratifizierung nach radikaler Zystektomie verbessern. Die Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) kann durch ihre hohe Sensitivität und die dynamische Breite eine Ergänzung zur etablierten Immunhistochemie darstellen.

Daher wurden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Wie ist die Markerexpression von MKI67, RACGAP1, VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 auf mRNA-Ebene im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom?
- Wie stellt sich die Verteilung und die Assoziation der Marker untereinander dar?
- Wie sind die Marker mit den klinischen und histopathologischen Parametern assoziiert?
- Haben die Marker eine prognostische Rolle im Krankheitsverlauf für Patienten nach radikaler Zystektomie im univariaten und multivariaten Modell?

2 MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Geräte, Materialien und Reagenzien sind im Anhang unter 7.1 aufgelistet. Die für die Genexpressionsanalyse verwendeten *Primer* und Sonden sowie die entstandenen Genprodukte sind ebenfalls im Anhang unter 7.2 zu finden.

2.1 Patientenkohorte

Es wurden retrospektiv 200 Patienten identifiziert, die im Zeitraum von 2008 bis 2011 an der Urologischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg einer radikalen Zystektomie aufgrund eines Blasenkarzinoms unterzogen worden sind. Insgesamt 92 dieser Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen. Gründe für einen Ausschluss waren (Abbildung 1): Fehlender histopathologischer Befund (n=11), kein Tumornachweis im Zystektomiepräparat (n=15), reines Carcinoma in situ (n=12), zu wenig Tumormaterial für eine RNA-Extraktion bzw. für eine eindeutige Identifikation des Tumors (n=10), kein Urothel- oder Plattenepithelkarzinom (n=18) und fehlende Verfügbarkeit des Tumormaterials (n=26). Die Patientenkohorte umfasste demnach 108 Patienten. Folgende Parameter wurden nach Durchsicht der Pathologiebefunde und mit Hilfe des klinikinternen Dokumentationsprogramms erhoben und dokumentiert: Geschlecht, Alter, T-Stadium, N-Stadium, M-Status, *Grading*, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion, simultanes Cis, Multifokalität und R-Status.

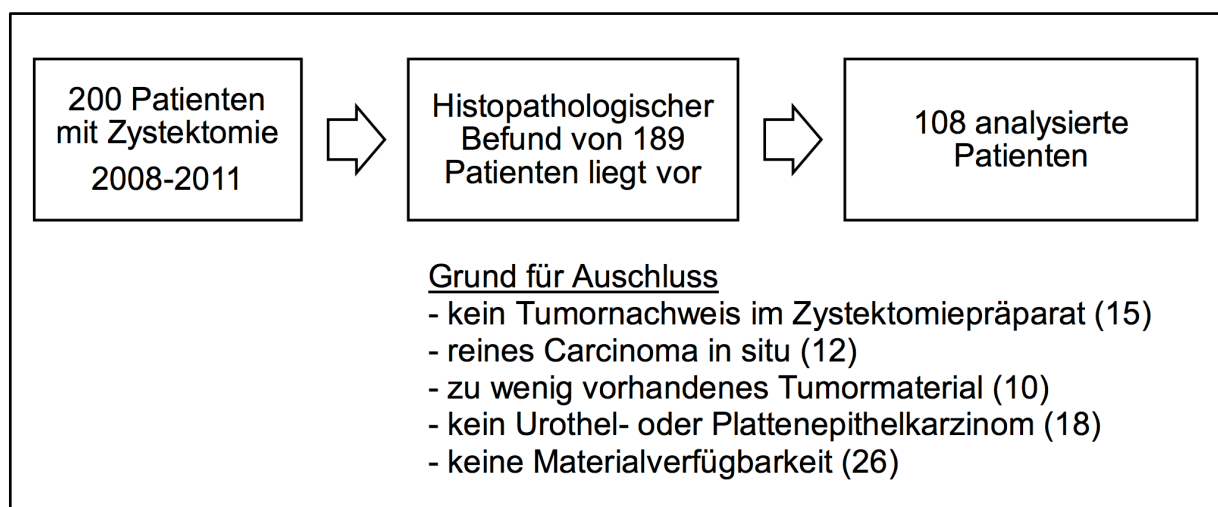


Abbildung 1: Kohortendiagramm: Darstellung der analysierten Kohorte mit ein- und ausgeschlossenen Patienten

Im Sinne einer Validierung der verwendeten Marker wurde die Genexpression an Blaugewebe von sechs weiteren Patienten gemessen, die keinen Tumornachweis (T0) im Zystektomiepräparat aufwiesen. Diese wurden jedoch separat von der untersuchten Kohorte betrachtet. Die uropathologische Diagnostik erfolgte durch das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim. Das Vorgehen entsprach etablierten histologischen Kriterien und folgte der aktuellsten Fassung der TNM-Klassifikation für das Urothelkarzinom der Harnblase der International Union against Cancer (Sobin et al., 2009). Für die Bestimmung des Tumorgradings wurde das dreistufige Gradingssystem (G1-G3) von 1973 verwendet, wie es für invasive Tumoren weiterhin parallel verwendet wird (Otto et al., 2011). Lymphgefäßinvasion wurde bei Nachweis von Tumorzellen in einem eindeutig einschichtigen, endothelialen Gefäß angenommen (Bolenz et al., 2010). Ein Ethikvotum der Ethik-Kommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg liegt unter dem Aktenzeichen 2016-814R-MA vor.

Das *Follow-Up* der eingeschlossenen Patienten hatte zum Ziel folgende Parameter für einen Zeitraum von mindestens drei Jahren ab dem Zeitpunkt der radikalen Zystektomie zu erheben: Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie (Protokoll, Anzahl der Zyklen), Erstdiagnose eines Rezidivs (Lokalrezidiv, Lymphknoten- oder Fernmetastasen), Durchführung einer sekundären Therapie, letzter Kontakt zum Patienten und Tod des Patienten sowie Todesursache. Zur Erhebung dieser Daten wurde eine Recherche im klinikinternen Dokumentationsprogramms durchgeführt. Gleichzeitig wurde ein Fragebogen (Anhang 7.3) an die behandelnden niedergelassenen Urologen und/oder Hausärzte gesendet. Daten, die danach noch gefehlt haben, wurden telefonisch oder persönlich direkt bei den behandelnden Ärzten erhoben. Durch dieses Vorgehen wurden die klinischen Endpunkte Rezidiv, Tod durch Urothelkarzinom und Tod jeglicher Ursache erhoben.

2.2 Probengewinnung

Für die Genexpressionsanalyse wurden tumortragende FFPE-Blöcke (Fresh Frozen Paraffin Embedded) von dem betreffenden Zystektomiepräparat verwendet. Auf den zugehörigen HE-Schnitten (Hämatoxylin-Eosin) wurde nach Anleitung und Supervision durch einen Pathologen das Vorhandensein des Tumors lichtmikroskopisch überprüft.

Des Weiteren wurde der Anteil des Tumors (Tumorzellen und Tumorstroma) am Gesamtschnitt ermittelt. Von jedem Patient wurde ein repräsentativer Gewebekblock ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass der ausgewählte Gewebekblock das korrekte Tumorstadium und die Invasionsfront beinhaltet.

Je Gewebekblock wurden mit einem Rotationsmikrotom mindestens je ein 3µm Schnitt (HE-Färbung) und ein 10µm Schnitt (RNA-Extraktion) angefertigt. Das weitere Vorgehen richtete sich nach dem Tumoranteil auf dem Schnitt (Abbildung 2). Bei einem Tumoranteil von über 50% wurde der ganze FFPE-Schnitt in ein Ribonuklease (RNase) freies 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Bei einem Tumoranteil von unter 50% wurde der Schnitt für ca. fünf Minuten in *Neo-Clear* eingelegt, um die Makrodissektion (Walch et al., 2001) zu erleichtern. Der zuvor auf dem HE-Schnitt markierte Tumor wurde nun mit einem sterilen Skalpell vom Objektträger in ein RNase freies 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Der mediane Tumorzellanteil der Proben für die RNA-Extraktion lag bei 42% mit einer *Interquartile Range* (IQR) von 30% bis 63,7%. Der minimale Tumorzellanteil betrug 10%, der maximale Anteil 100%.

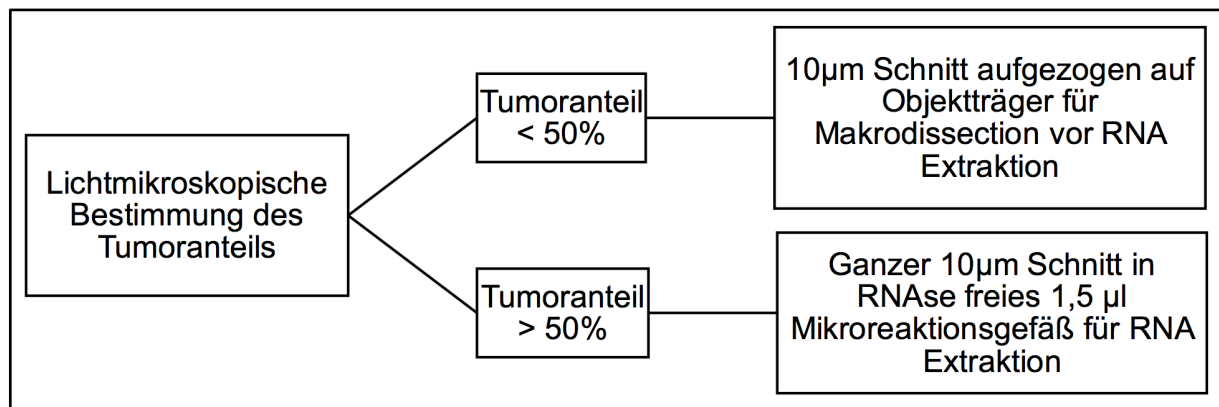


Abbildung 2: Probengewinnungsprozess in Abhängigkeit vom Tumoranteil

2.3 RNA-Expressionsanalyse

2.3.1 RNA-Extraktion aus FFPE-Tumorgewebe

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus FFPE-Tumorgewebe wurde mit dem auf magnetischen *Beads* bestehenden *XTRAKT FFPE Kit (96)* entsprechend den Angaben des

Herstellers durchgeführt. Die FFPE-Gewebeproben wurden in RNase freie Mikroreaktionsgefäßen überführt. Zunächst wurde jede Probe zusammen mit Paraffin-Lyse-Puffer für 30 Minuten bei 80°C und 1200 rpm in einem Thermomix inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf 65°C und Zugabe von Proteinase K folgte ein weiterer Inkubationszyklus. Nun wurden jeder Probe *MagiX-RNA* Bindepuffer sowie mit Germanium beschichtete magnetische *MagiX-Beads* zugesetzt. Es folgten drei Waschvorgänge bestehend aus Magnetisierung, Verwerfen des Überstands und Zugabe eines Waschpuffers zur Aufreinigung der Proben. Nach der Aspiration des Überstands des letzten Waschpuffers wurden die Proben zentrifugiert, erneut magnetisiert und der restliche Überstand vorsichtig aspiriert und verworfen. Jeder Probe wurde nun ein Elutionspuffer zugesetzt und diese dann erneut im Thermomix inkubiert. Schließlich folgte eine letzte Magnetisierung und der Überstand, bestehend aus der gelösten RNA und dem Elutionspuffer, wurde in ein frisches 1,5µl RNase freies Mikroreaktionsgefäß transferiert. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde direkt im Anschluss zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.3.2 Reverse Transkription von FFPE-RNA (SSIIIRT) und Zelllinien RNA (M-MLV RT)

Reverse Transkription bezeichnet die Umwandlung von RNA in komplementäre DNA, sogenannte cDNA (*complementary DNA*). Die entstandene cDNA kann mittels qPCR quantifiziert werden. Das zentrale Enzym der reversen Transkription ist das Enzym Reverse Transkriptase, das die Umschreibung von einsträngiger RNA in doppelsträngige cDNA katalysiert. Weitere notwendige Bestandteile der Reaktion sind: Desoxygenierte Nukleosidtriphosphate (dNTP), die als Substrat der reversen Transkriptase dienen, Primer zur Markierung des Startpunktes der reversen Transkriptase auf der RNA, Puffer zur Schaffung eines optimalen chemischen Reaktionsmileus sowie RNase-Inhibitoren. Des Weiteren wird ein Wärmeblock oder *Thermocycler* benötigt, um die Reaktion auf der für die jeweiligen Enzyme idealen Temperatur zu halten. Für eine cDNA-Synthese im Allgemeinen gilt folgendes Vorgehen: Zunächst wird die RNA für 10 Minuten auf ca. 65°C erhitzt um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Nach Abkühlung für eine Minute auf Eis werden dNTPs, Primer und Puffer und RNase-Inhibitoren zugegeben. Danach wird der Reaktionsansatz für 120 Minuten bei ca. 55°C inkubiert. In dieser Zeit findet die Reverse Transkription statt. Danach wird der Ansatz zur Inaktivierung der Enzyme kurz auf 70°C erhitzt. Für RNA aus Zelllinien-Lysaten

erfolgte in der vorliegenden Untersuchung die cDNA-Synthese mit dem *M-MLV (Moloney Murines Leukämie Virus) Reverse Transcriptase Kit*. Die cDNA-Synthese von RNA aus FFPE-Gewebeproben wurde mit dem *Superscript III Reverse Transcriptase Kit* durchgeführt.

Für die **reverse Transkription von RNA aus Zelllinienlysaten** wurde das *M-MLV Reverse Transcriptase Kit* verwendet. Es handelt sich dabei um die Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit einem Volumen von 20µl (oder einem Vielfachen davon) ist in Tabelle 1 angegeben. Nach Messung der RNA-Konzentration mit dem Nanodrop Spectrophotometer wurden 2µg RNA mit nukleasefreiem Wasser auf 10µl Volumen verdünnt. Darauf folgte die Inkubation der verdünnten RNA von 10 Minuten bei 65°C im Thermomixer und Zugabe des cDNA-Synthese-Mastermixes. Danach wurden die cDNA-Synthese im Flex-Cycler mit folgender Programmierung gestartet: 120 Minuten bei 37°C, 15 Minuten bei 70 °C, *Hold* bei 4°C. Die Lagerung der neu synthetisierten Zelllinien cDNA erfolgte bei -20°C.

Tabelle 1: Reaktionsansatz cDNA-Synthese mit M-MLV Reverse Transcriptase

	RNA	10µl
cDNA-Synthese Mastermix	M-MLV RT (200U/µl)	1µl
	RNAseOUT™	1µl
	10mM dNTP Mix	1µl
	5mg/ml p(dN) ₆ Random Primer	1µl
	0,1 M DTT	2µl
	5x First Strand Buffer	4µl
	Volumen Mastermix:	10µl

Für die **reverse Transkription von RNA aus FFPE-Gewebeproben** wurde das *SSIII Reverse Transcriptase Kit (96)* mit sequenzspezifischen *Primern* verwandt. Das Reaktionsvolumen betrug 40µl (oder ein Vielfaches). Die Durchführung der cDNA-Synthese mit sequenzspezifischen Primern war für ein Maximum von fünf Genen auf einmal möglich. Primer der Referenzgene und Zielgene wurden zum gleichen Ansatz hinzugefügt. Die 40µl Reaktionsvolumen setzten sich aus 14µl Primermix, 10µl RNA und 16µl cDNA-Synthese Mastermix zusammen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2 aufgelistet. Zunächst wurde die Konzentration der RNA mittels *Nanodrop-Spectrophotometer* bestimmt. Jedem Primermix wurde RNA hinzugefügt,

gefolgt von einer Inkubation über zehn Minuten bei 65°C auf dem Thermomix. Nach kurzem Abkühlen wurde jeder Probe der cDNA-Synthese Mastermix zugefügt. Danach wurde der fertige Reaktionsansatz im *Flex Cycler* mit folgender Programmierung positioniert: 120 Minuten bei 55°C, 15 Minuten bei 70°C, *Hold* bei 4°C. Die Lagerung der neu synthetisierten cDNA erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2: Reaktionsansatz cDNA-Synthese mit Superscript III Reverse Transcriptase

Primermix	Primer (je 1µl)	5µl (4µl)
	dNTP	2µl
	Nuclease freies Wasser	7µl (8µl)
	Volumen Primermix:	14µl
	RNA	10µl
cDNA-Synthese Mastermix	SS III RT (200U/µl)	4µl
	0,1 M DDT	2µl
	5x First Strand Buffer	8µl
	RNAseOUT™	2µl
	Volumen Mastermix:	16µl

2.3.3 Quantitative PCR

In dieser Arbeit wurde die qPCR mit *TaqMan* Sonden durchgeführt. Dabei gibt es neben den *reverse* und *forward Primern* noch ein drittes Oligonukleotid, welches so gewählt wurde, dass es zwischen beiden *Primern* hybridisiert. Dieses als *TaqMan* Sonde bezeichnete Oligonukleotid ist an seinen beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Am 5'-Ende sitzt der sogenannte *Reporter* und am 3'-Ende der *Quencher*. Ist das Oligonukleotid intakt, wird das Licht, das vom *Reporter* ausgestrahlt wird, vom *Quencher* unter Ausnutzung des Förster-Resonanz-Energie-Transfers unterdrückt. Wird das Oligonukleotid jedoch gespalten, steigt die Lichtproduktion des *Reporters*. Nach Bindung an die zu amplifizierende cDNA kommt es also zunächst zu keinem bzw. nur einem schwachen Lichtsignal. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase kommt es nun bei jedem Amplifikationszyklus zu einer Spaltung der Sonde und damit zu einer Steigerung der Lichtproduktion, welche bei jedem Zyklus erfasst werden kann.

In einer idealen Reaktion mit einer Effizienz von 1 verdoppelt sich die Menge der DNA mit jedem Replikationszyklus. Zunächst findet also eine exponentielle Amplifikation (vgl. Formel 1) statt, bis das PCR Produkt akkumuliert und nicht mehr genug *Primer* und Polymerase für eine effiziente Replikation zur Verfügung stehen, sodass ein Reaktionsplateau erreicht wird. Der CT-Wert (*Cycle Threshold*), der bei der qPCR gemessen wird ist der Zyklus, an dem das Fluoreszenzniveau (ΔR_n) einen zuvor definierten Schwellenwert während der exponentiellen Phase der qPCR Reaktion erreicht. Eine Differenz im CT-Wert von 1 entspricht damit einem Unterschied von 100% DNA zum Reaktionsbeginn.

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

Formel 1: Amplifikation der DNA während der exponentiellen Phase. X_n – DNA Menge zum Zeitpunkt n , X_0 - DNA Menge zum Zeitpunkt 0, E_x - Effizienz der Amplifikation (Livak and Schmittgen, 2001)

Die qPCR wurde als *Singleplex*-PCR mit einer *Primer*/Sondenkonzentration von 10pmol/ μ l auf einer 96-Well Platte durchgeführt. Der Reaktionsansatz pro Well ist in Tabelle 3 dargestellt. Von jeder untersuchten cDNA wurden im gleichen PCR-Lauf zusätzlich zu den Zielgenen (MKI67, RACGAP1, VEGFR-3, VEGF-C und VEGF-D) die Referenzgene CALM (Calmodulin) und RPL37A (*Ribosomal Protein L37a*) bestimmt. Alle Messungen erfolgten als Duplikate, die weiteren Berechnungen wurden mit dem arithmetischen Mittel der Duplikate durchgeführt. Als Positivkontrolle und Calibrator diente die cDNA der Zelllinie UMUC (UMUC-3, ATCC CRL-1749; Ursprung: Harnblase, Urothelkarzinom).

Es wurde das *StepOnePlus Real-Time PCR System* mit folgendem Protokoll verwendet: 20 Sekunden bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen je 3 Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 60°C. Die verwendete Software zur Konfiguration der PCR war die *StepOne Software v2.2.2*.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die quantitative PCR

qPCR-Master Mix	TaqMan Fast Advanced Master Mix	5µl
	nukleasefreies Wasser	1µl
	Forward-Primer	0,375µl
	Reverse-Primer	0,375µl
	Sonde	0,25µl
	Volumen Master Mix	7µl
	cDNA-Template	3µl

Der Schwellenwert für die Detektion des Fluoreszenzsignals (*Threshold*) und die Anzahl der Zyklen zur Definition der Hintergrundfluoreszenz (*Baseline*) wurden für jedes Gen einzeln festgelegt und in allen durchgeführten qPCRs angewandt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Thresholds und zugehörige Baseline

Genbezeichnung	Threshold	Baseline
Calm	0,43	3-15
RPL37A	0,41	3-15
MKI67	0,17	3-15
RACGAP1	0,35	3-15
VEGFR-3	0,23	3-15
VEGF-C	0,07	3-23
VEGF-D	0,08	3-23

2.3.4 Primeretablierung (Detektionslimits, Effizienz)

Um die Effizienzen der verwendeten Primer zu ermitteln wurden Verdünnungsreihen mit cDNA der Zelllinie UMUC durchgeführt (Hellemans et al., 2007). Für die Gene MKI67, RACGAP1, VEGFR-3 und VEGF-C wurde die cDNA von UMUC über fünf Stufen zehnfach (0,1-0,00001) verdünnt. Da bei VEGF-D schon in niedrigen Verdünnungsstufen das Detektionslimit erreicht wird, wurde hier die cDNA von UMUC über vier Stufen je 1:1 verdünnt (0,5-0,0625). Aus der exponentiellen Kinetik der PCR Amplifikation ergeben sich in einer idealen PCR mit jeder 1:10 fachen Verdünnungsstufe linear ansteigende CT Werte (Formel 2). Die Steigung der Geraden wurde mithilfe linearer Regression berechnet.

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{slope}}\right)} - 1$$

Formel 2: Berechnung der Effizienz (E) ausgehend von der Steigung der Verdünnungskurve (Slack et al., 2001).

2.3.5 Quantifizierung von qPCR Daten

Es stehen generell zwei Methoden zur Quantifizierung von qPCR Daten zur Verfügung: Absolute und relative Quantifizierung. Die absolute Quantifizierung benötigt eine Kalibrierungskurve, die auf einer Verdünnungsreihe mit *Templates* bekannter Konzentration wie zum Beispiel Plasmiden beruht. Bei der hier verwandten relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens in Bezug zur Expression eines Referenzgens gesetzt (Normalisierung). Als Referenzgene (*Housekeeping Gene*) werden Gene bezeichnet, welche einer geringeren Regulation unterliegen und ubiquitär und homogen exprimiert werden. Durch die Normalisierung mit einem Referenzgen lassen sich Gewebe- und Matrixeffekte, Unterschiede in der Ausbeute der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese zwischen verschiedenen Proben reduzieren, da dadurch gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betroffen sind (Pfaffl, 2004). In dieser Studie wurde das Referenzgen RPL37A zur Normalisierung der Genexpressionsdaten verwendet.

Zur relativen Quantifizierung wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet (Tabelle 5). Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode gibt die normalisierte mRNA-Expression des Zielgens in der zu untersuchenden Probe relativ zur Expression des Zielgens in der Positivkontrolle an, die auch als Kalibrator bezeichnet wird (Livak and Schmittgen, 2001). Die Wahl des Kalibrators spielt für die relative Quantifizierung keine Rolle (Hellemans et al., 2007). Voraussetzung für die Anwendung dieser Methoden ist, dass die Effizienzen der quantitativen PCR für Zielgen und Referenzgen ungefähr gleich sind.

Tabelle 5: Quantifizierungsmethoden der relativen Quantifizierung

 $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode

$$\Delta CT_{\text{Probe}} = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta CT_{\text{Kalibrator}} = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Probe}} - \Delta CT_{\text{Kalibrator}}$$

$$\text{Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

2.4 Statistische Auswertung der Daten

Die Endpunkte rezidivfreies Überleben, krankheitsspezifisches Überleben und Gesamtüberleben wurden vom Zeitpunkt der radikalen Zystektomie erhoben. Überlebende Patienten wurden in der statistischen Analyse zum Zeitpunkt des letzten Kontaktes zensiert. Als Rezidiv wurde jedes Wiederauftreten des Tumors gewertet, sei es ein Lokalrezidiv oder die Feststellung von Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Beratung durch die Abteilung für Medizinische Statistik der Medizinischen Fakultät Mannheim. Kontinuierliche Variablen wurden als Median mit der jeweiligen *Interquartile Range* (IQR) angegeben. Unterschiede in der Genexpression der Zielgene zwischen verschiedenen klinischen und histopathologischen Patientencharakteristika wurden mit nicht-parametrischen Tests ermittelt. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Man-Whitney-U-Test verwendet, bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis Test. Die Korrelation der Genexpression der Zielgene untereinander wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt. Als *Cut-off-Wert* für die Genexpression wurden die Quartilsgrenzen verwendet. Alle p-Werte wurden zweiseitig getestet, ein $p < 0,05$ gilt als statistisch signifikant. Statistische Berechnungen sowie Grafiken wurden mit der Software *Graph Pad Prism* (Version 7, La Jolla, USA). Das Uni- und Multivariate *Proportional Hazards Model* bezüglich der klinischen Endpunkte wurde mit *SAS JMP* (Version 12, Cary, USA) durchgeführt. Überlebenskurven wurden mit der *Kaplan-Meier-Methode* erstellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Primeretablierung an Zelllinien cDNA

Aus der exponentiellen Kinetik der PCR Amplifikation ergaben sich linear ansteigende CT Werte mit jeder zehnfachen Verdünnungsstufe (Tabelle 6). Die erhobenen Effizienzen lagen im Bereich zwischen 0,95 und 1,27 mit einem Bestimmtheitsmaß $r^2 > 0,987$. Abbildung 3 zeigt die linear verlaufenden Verdünnungskurven der verwendeten Primer.

Tabelle 6: Überblick über die Effizienzen der verwendeten Primer

Genbezeichnung	Verdünnungsstufen	Effizienz (95% KI)	r^2
Calm	1:10 - 1:10 ⁷	1,18 (1,04-1,36)	0,9934
RPL37A	1:10 - 1:10 ⁸	1,07 (1,02-1,12)	0,9992
MKI67	1:10 - 1:10 ⁶	1,26 (1,20-1,31)	0,9995
RACGAP1	1:10 - 1:10 ⁶	1,27 (1,10-1,51)	0,9939
VEGFR-3	1:10 - 1:10 ⁴	0,99 (0,66-1,86)	0,9871
VEGF-C	1:10 - 1:10 ⁵	1,01 (0,87-1,20)	0,996
VEGF-D	1 - 1:10	0,95 (0,81-1,10)	0,9974

r^2 = Bestimmtheitsmaß

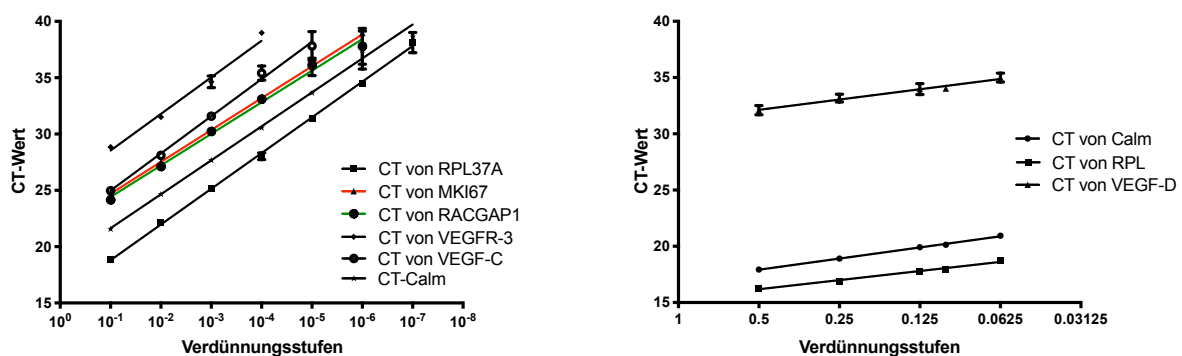


Abbildung 3: Verdünnungskurven der Zelllinie UMUC für die Gene RPL37A, Calm, MKI67, RACGAP1, VEGFR-3 und VEGF-C. Es zeigt sich ein linearer Verlauf. Messpunkte zeigen jeweils den Mittelwert und Standardabweichung der Doppelbestimmungen.

3.2 Klinische Daten der Patientenkohorte und *Follow-Up*

Die untersuchte Patientenkohorte bestand aus 108 Patienten. Die Mehrheit der Patienten (79,6%) war männlich, das mediane Alter zum Zeitpunkt der Zystektomie betrug 72 Jahre. Lymphknotenmetastasen (pN+) lagen bei 21 (19,45%) Patienten vor. Bei sieben Patienten wurde keine Lymphadenektomie vorgenommen, bei drei davon aufgrund einer metastasierten Situation. Eine Lymphgefäßinvasion lag bei 44 (40,74%) und eine Blutgefäßinvasion bei 21 (19,44%) Patienten vor. Fernmetastasen lagen zum Zeitpunkt der Operation bei elf Patienten (10,19%) vor. Die weiteren demographischen, sowie klinisch-pathologischen Kennzahlen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Zusätzlich zur Patientenkohorte wurde die Genexpression an Blasengewebe von sechs weiteren Patienten gemessen, die keinen Tumorrest (T0) im Zystektomiepräparat aufwiesen (Tabelle 14).

Tabelle 7: Demographische und klinisch-pathologische Übersicht über die untersuchte Patientenkohorte

Variable	N	%
Geschlecht		
<i>männlich</i>	86	79,63
<i>weiblich</i>	22	20,37
Alter		
<i>< 75 Jahre</i>	68	62,96
<i>≥ 75 Jahre</i>	40	37,04
Grading		
<i>G1</i>	1	0,93
<i>G2</i>	32	29,63
<i>G3</i>	75	69,44
Differenzierung		
<i>Urothel</i>	104	96,30
<i>Plattenepithel</i>	2	1,85
<i>Mischtyp (Plattenepithel/Urothel)</i>	2	1,85
T-Stadium		
<i>pTa/pT1</i>	12	11,11
<i>pT2</i>	28	25,93
<i>pT3</i>	47	43,52
<i>pT4</i>	21	19,44

N-Stadium			
<i>pN0</i>	78	72,22	
<i>pN1</i>	11	10,19	
<i>pN2</i>	9	8,33	
<i>pN3</i>	1	0,93	
<i>unklar</i>	9	8,33	
M-Stadium			
<i>Mx/M0</i>	96	88,89	
<i>M1</i>	11	10,19	
<i>Unklar</i>	1	0,93	
Lymphgefäßinvasion (LVI)			
<i>LVI -</i>	60	55,56	
<i>LVI +</i>	44	40,74	
<i>unklar</i>	4	3,70	
Blutgefäßinvasion (VI)			
<i>VI -</i>	82	75,93	
<i>VI +</i>	21	19,44	
<i>unklar</i>	5	4,63	
Simultanes Cis			
<i>nein</i>	63	58,33	
<i>ja</i>	45	41,67	
Positiver R-Status			
<i>nein</i>	96	88,89	
<i>ja</i>	11	10,19	
<i>unklar</i>	1	0,93	

Der mediane Beobachtungszeitraum (Zeit von der radikalen Zystektomie bis zum Tod der Patienten bzw. bis zum letzten Kontakt) betrug 23,2 Monate (Tabelle 9). 39,81% der Patienten erlitten ein Rezidiv. Mit 20 Fällen waren Lokalrezidive am häufigsten, gefolgt von Knochen- und Lymphknotenmetastasen in 17 bzw. 16 Fällen. 57,41% der Patienten verstarben im Beobachtungszeitraum und bei insgesamt 41,67% war das Harnblasenkarzinom die Todesursache (Tabelle 8).

Tabelle 8: Auftrittshäufigkeit klinischer Endpunkte

Variable		N	%
Auftreten eines Rezdivs	<i>nein</i>	48	44,44
	<i>ja</i>	43	39,81
	<i>unklar</i>	17	15,74
Tod jeglicher Ursache	<i>nein</i>	46	42,59
	<i>ja</i>	62	57,41
Tod durch Urothelkarzinom	<i>nein</i>	54	50,00
	<i>ja</i>	45	41,67
	<i>unklar</i>	9	8,33

Das mediane rezidivfreie Überleben der Patienten, die im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv erlitten, lag bei 9,6 Monaten. Die Gesamtüberlebenszeit bzw. krankheitsspezifische Überlebenszeit betrug unter den Patienten, die im Beobachtungszeitraum gestorben sind 12,8 bzw. 12,7 Monate (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zeit bis zum Auftreten klinischer Endpunkte

Variable	Median (Monate)	IQR
Beobachtungszeitraum	23,2	10,2-51,8
Rezidivfreies Überleben	9,6	5,8-17,1
Gesamtüberleben	12,8	7,7-23,1
Krankheitsspezifisches Überleben	12,7	7,4-22,5

3.3 Auswertung der Markerexpression am Patientenkollektiv

3.3.1 Deskriptive Übersicht der Markerexpression

Die medianen CT-Werte der Referenzgene (Abbildung 4) waren für Calm 23,95 (IQR 22,95-25,55) und für RPL37A 22,5 (IQR 21,65-23,96). Für die Zielgene lagen die Mediane für MKI67 bei 29,1 (IQR 27,62-30,83), für RACGAP1 bei 29,3 (IQR 27,83-30,87),

für VEGFR-3 bei 30,19 (IQR 28,89-31,61), für VEGF-C bei 31,83 (IQR 30,68-33,54) und für VEGF-D bei 31,45 (IQR 30,15-32,41).

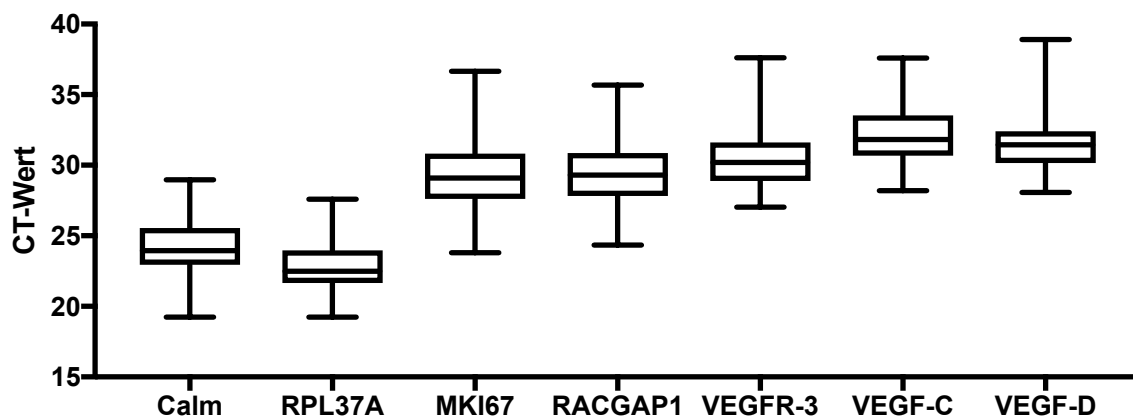


Abbildung 4: Verteilung der CT-Werte der einzelnen Gene im gesamten Patientenkollektiv (n=108) und der Subgruppe T0 Präparate (n=6). Dargestellt als Box-Plots (Median, IQR, Min-Max).

Nach Normalisierung der CT-Werte mit dem Referenzgen RPL37A mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode und UMUC als Kalibrator ergaben sich folgende (normalisierte) Genexpressionen (Tabelle 10). Testung auf Normalverteilung mittels D'Agostino & Pearson Normalitätstest ergab, dass für keines der Gene eine Normalverteilung vorlag (p jeweils $< 0,0001$).

Tabelle 10: Genexpression der untersuchten Gene im gesamten Patientenkollektiv

Genbezeichnung	Genexpression	
	Median	IQR
MKI67	0,5322	0,2551-0,8318
RACGAP1	0,1312	0,07824-0,204
VEGFR-3	6,692	3,873-11,34
VEGF-C	0,183	0,122-0,2789
VEGF-D	122,1	68,85-254,5

3.3.2 Coexpression der untersuchten Gene

Die Coexpression der Gene wurde mittels nicht-parametrischer Korrelation nach Spearman untersucht (Tabelle 11).

Tabelle 11: Coexpression der untersuchten Gene in den Patientenproben

		RACGAP1	VEGFR-3	VEGF-C	VEGF-D
MKI67					
	r	0,9027	0,3238	0,2116	-0,2028
	p-Wert	<0,0001	0,0004	0,0244	0,0305
RACGAP1					
	r		0,332	0,1554	-0,1801
	p-Wert		0,0003	0,1002	0,0551
VEGFR-3					
	r			0,3475	0,1957
	p-Wert			0,0002	0,0370
VEGF-C					
	r				0,1818
	p-Wert				0,0540

r=Spearman Rangkorrelationskoeffizient und p-Werte, signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

Zwischen der Expression von MKI67 und RACGAP1 wurde ein starker positiver Zusammenhang festgestellt mit einem Rangkorrelationskoeffizienten von $r = 0,9027$ und $p < 0,0001$ (Abbildung 5). Weitere signifikante Korrelationen konnten zwischen der Expression von MKI67 mit VEGFR-3, VEGF-C und VEGF-D, sowie RACGAP1 mit VEGFR-3, sowie VEGFR-3 mit VEGF-C und VEGF-D nachgewiesen werden.

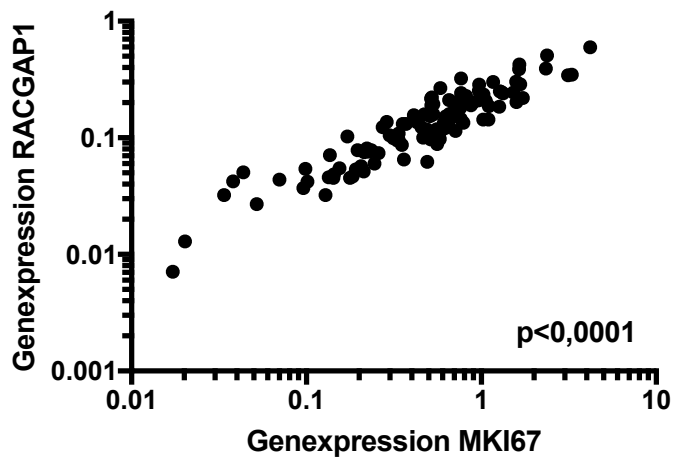


Abbildung 5: Korrelation der Genexpression von MKI67 und RACGAP1. Spearman $r = 0,9027$. Eine hohe Expression von MKI67 geht mit einer hohen Expression von RACGAP1 einher.

3.3.3 Genexpression in Bezug auf histopathologische Parameter

Die Genexpression wurde in Bezug auf die folgenden klinischen und histopathologischen Parameter untersucht: Geschlecht, Alter, T-Stadium, N-Stadium, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion, *Grading* und Vorliegen eines simultanen Carcinoma in situ (hier als simultanes Cis) bezeichnet. Zunächst wird die Genexpression der Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 beschrieben (Tabelle 12).

Tabelle 12: Genexpression der Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 in Bezug auf klinische und histopathologische Parameter.

	MKI67	RACGAP1
Variable (n)	2^{-ΔΔCT} Median (IQR)	2^{-ΔΔCT} Median (IQR)
Geschlecht		
m (86)	0,55 (0,28-0,96)	0,13 (0,09-0,21)
w (22)	0,60 (0,45-0,76)	0,16 (0,10-0,22)
p-Wert	0,4276	0,1921
Alter		
< 75 Jahre (68)	0,52 (0,52-0,76)	0,12 (0,08-0,19)
≥ 75 Jahre (40)	0,68 (0,36-1,01)	0,17 (0,10-0,23)
p-Wert	0,0738	0,0835
T-Stadium		
Ta/T1 (12)	0,33 (0,13-0,53)	0,08 (0,06-0,12)
T2 (28)	0,59 (0,32-1,01)	0,15 (0,10-0,24)
T3 (47)	0,60 (0,36-0,97)	0,14 (0,10-0,20)
T4 (21)	0,56 (0,43-0,76)	0,12 (0,10-0,21)
p-Wert	0,0689	0,0491
N-Stadium		
pN0 (78)	0,54 (0,30-0,96)	0,14 (0,09-0,22)
pN + (21)	0,57 (0,49-0,75)	0,12 (0,10-0,18)
p-Wert	0,6875	0,5956
Lymphgefäßinvasion		
LVI- (60)	0,53 (0,33-0,85)	0,13 (0,08-0,21)
LVI+ (44)	0,58 (0,34-0,86)	0,14 (0,10-0,20)
p-Wert	0,3997	0,6737
Blutgefäßinvasion		
V- (82)	0,56 (0,34-0,90)	0,13 (0,10-0,22)
V+ (21)	0,54 (0,32-0,75)	0,13 (0,10-0,16)
p-Wert	0,7558	0,5285
Grading		
G1/G2 (33)	0,37 (0,21-0,65)	0,10 (0,06-0,22)
G3 (75)	0,60 (0,54-0,97)	0,14 (0,10-0,20)
p-Wert	0,0205	0,1343
Simultanes Cis		
Negativ (63)	0,56 (0,27-0,76)	0,12 (0,09-0,20)
Positiv (45)	0,60 (0,33-0,96)	0,14 (0,10-0,22)
p-Wert	0,7815	0,5185

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

Die Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 zeigten in einer univariaten Betrachtung eine positive Korrelation mit steigendem T-Stadium (Abbildung 6). In einer zusammenfassenden Betrachtung zwischen allen nicht-muskelinvasiven (Ta/T1) und allen muskelinvasiven ($\geq T2$) Patientenproben ergaben sich folgende Ergebnisse: MKI67 Ta/T1 vs. $\geq T2$ $p = 0,0075$ und RACGAP1 Ta/T1 vs. $\geq T2$ $p = 0,0046$.

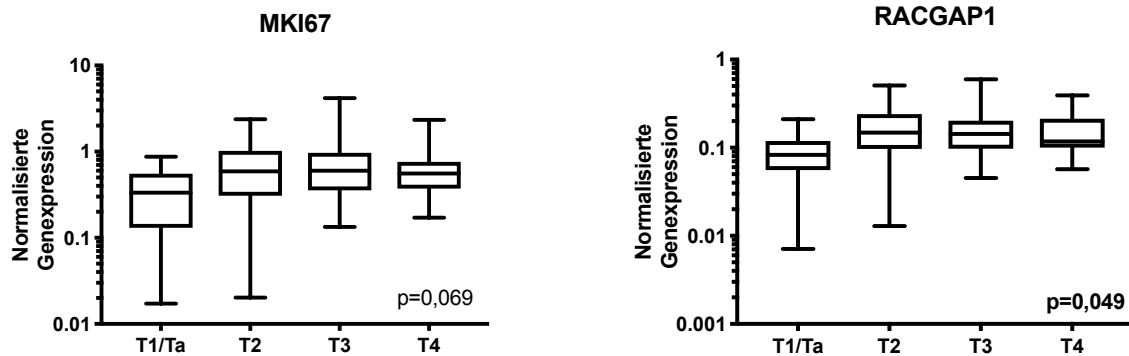


Abbildung 6: Genexpression der Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 in Bezug auf das T-Stadium (T1/Ta: $n=12$; T2: $n=28$; T3: $n=47$; T4: $n=21$). Dargestellt als Box-Plots (Median, IQR, Min-Max), signifikante p -Werte sind fett gedruckt.

In Bezug auf das Grading bestand ein signifikanter Unterschied in der Expression von MKI67 zwischen G1/G2 und G3 Tumoren ($p = 0,0201$). Für RACGAP1 konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,1357$) (Abbildung 7).

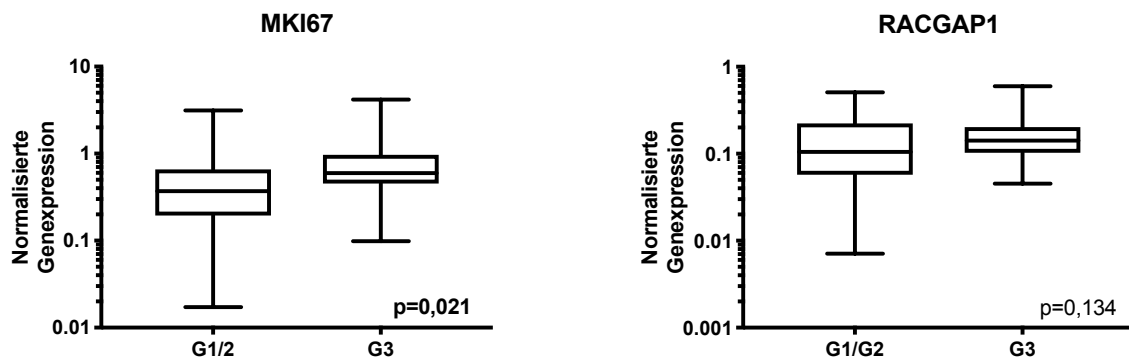


Abbildung 7: Genexpression von MKI67 und RACGAP1 in Bezug auf Grading (G1/2: $n=33$; G3: $n=75$). Dargestellt als Box-Plots (Median, IQR, Min-Max), signifikante p -Werte sind fett gedruckt.

Für die klinischen Parameter Geschlecht, Alter, Lymphknotenstatus, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion und simultanes Cis konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der untersuchten Proliferationsmarker festgestellt werden.

Die mRNA-Expression der Gene des VEGF-R/VEGF Systems, VEGFR-3, VEGF-C und VEGF-D ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Genexpression der Marker VEGFR-3, VEGF-C und VEGF-D in Bezug auf klinische und histopathologische Parameter.

	VEGFR-3	VEGF-C	VEGF-D
Variable (n)	2 ^{-ΔΔCT} Median (IQR)	2 ^{-ΔΔCT} Median (IQR)	2 ^{-ΔΔCT} Median (IQR)
Geschlecht			
m (86)	6,19 (3,83-10,20)	0,18 (0,13-0,27)	115,48 (62,88-219,61)
w (22)	9,33 (5,02-14,22)	0,17 (0,10-0,28)	93,74 (69,70-190,34)
p-Wert	0,1389	0,5895	0,5934
Alter			
< 75 Jahre (68)	6,18 (3,55-11,58)	0,18 (0,11-0,30)	108,24 (64,59-208,78)
≥ 75 Jahre (40)	7,60 (4,99-11,63)	0,19 (0,13-0,27)	118,10 (58,84-254,63)
p-Wert	0,4722	0,7918	0,4265
T-Stadium			
Ta/T1 (12)	2,44 (1,28-6,62)	0,11 (0,07-0,21)	63,80 (24,58-225,90)
T2 (28)	6,23 (3,28-14,45)	0,16 (0,10-0,25)	142,17 (71,31-262,78)
T3 (47)	6,47 (4,24-9,85)	0,20 (0,13-0,32)	116,53 (74,70-246,41)
T4 (21)	8,60 (5,98-16,09)	0,21 (0,13-0,30)	84,93 (62,88-158,74)
p-Wert	0,0091	0,0587	0,3156
N-Stadium			
pN0 (78)	6,28 (3,63-10,98)	0,18 (0,12-0,26)	113,78 (69,70-204,32)
pN + (21)	8,60 (5,89-13,27)	0,21 (0,12-0,30)	144,35 (84,68-232,18)
p-Wert	0,0284	0,6247	0,3598
Lymphgefäßinvasion			
LVI- (60)	5,07 (3,18-9,43)	0,18 (0,12-0,27)	108,24 (58,99-204,43)
LVI+ (44)	7,49 (5,13-12,93)	0,18 (0,11-0,29)	128,13 (84,80-243,32)
p-Wert	0,0160	0,9162	0,2186
Blutgefäßinvasion			
V- (82)	6,94 (3,83-10,98)	0,18 (0,12-0,27)	113,78 (61,31-219,39)
V+ (21)	5,73 (4,65-10,31)	0,16 (0,10-0,32)	122,40 (84,68-219,61)
p-Wert	0,8829	0,7065	0,8571
Grading			
G1/G2 (33)	6,65 (3,83-9,38)	0,18 (0,11-0,25)	127,66 (71,86-190,34)
G3 (75)	6,73 (4,19-12,59)	0,18 (0,12-0,28)	100,76 (57,09-225,34)
p-Wert	0,2527	0,6387	0,4332
Simultanes Cis			
Negativ (63)	8,38 (4,65-12,59)	0,21 (0,13-0,32)	112,85 (69,70-219,61)
Positiv (45)	5,13 (3,63-8,71)	0,16 (0,11-0,23)	116,53 (61,22-213,10)
p-Wert	0,0263	0,0192	0,7201

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

In Bezug auf das T-Stadium wurde eine positive Korrelation mit der Expression von VEGFR-3 $p = 0,0091$ und VEGF-C $p = 0,0587$ gefunden (Abbildung 8). Auch hier ist der maßgebliche Unterschied in der Genexpression zwischen den nicht-muskelinvasiven Stadien (Ta/T1) und den muskelinvasiven Stadien ($\geq T2$) zu beobachten: VEGFR-3 Ta/T1 vs. $\geq T2$ $p = 0,0028$; VEGF-C Ta/T1 vs. $\geq T2$ $p = 0,0385$.

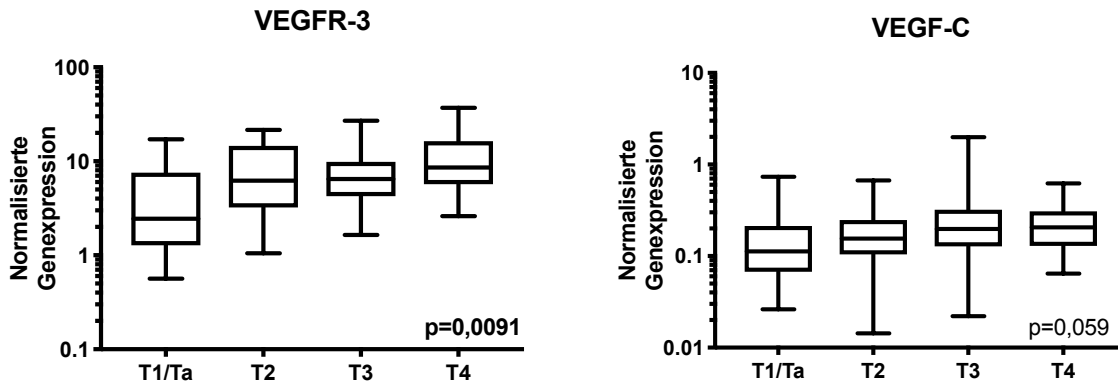


Abbildung 8: Genexpression von VEGFR-3 und VEGF-C in Bezug auf das T-Stadium (T1/Ta: $n=12$; T2: $n=28$; T3: $n=47$; T4: $n=21$). Dargestellt als Box-Plots (Median, IQR, Min-Max), signifikante p -Werte sind fett gedruckt.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Genexpression von VEGFR-3 in Patienten mit Lymphknotenmetastasen $p = 0,0284$ und in Patienten mit positiver Lymphgefäßinvasion $p = 0,0160$ (Abbildung 9).

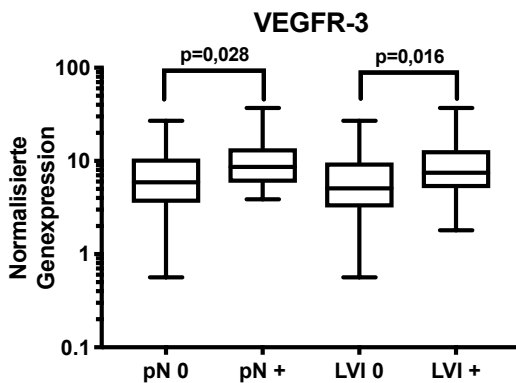


Abbildung 9: Genexpression von VEGFR-3 in Bezug auf N-Stadium (pN0: $n=78$; pN+: $n=21$) und Lymphgefäßinvasion (LVI 0: $n=60$; LVI +: $n=44$). Dargestellt als Box-Plots (Median, IQR, Min-Max), signifikante p -Werte sind fett gedruckt.

Des Weiteren zeigte sich in Patientenproben mit simultanem Cis eine signifikant niedrige Expression von VEGFR-3 und VEGF-C (Abbildung 10).

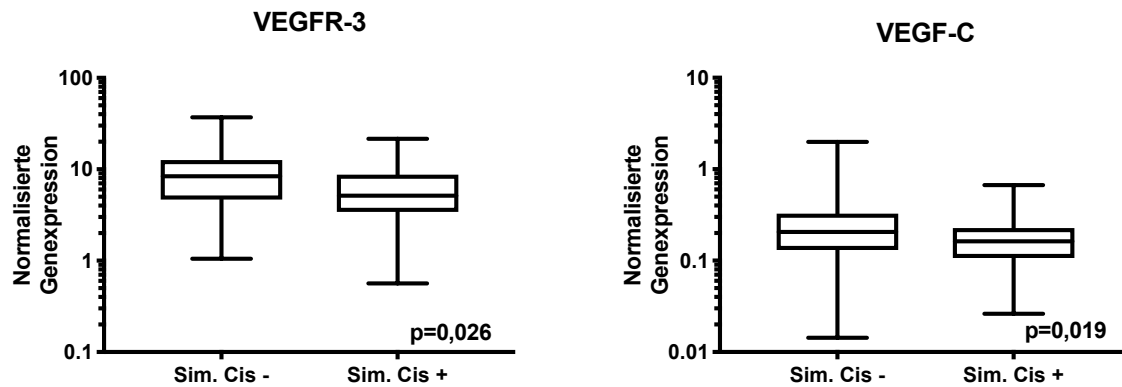


Abbildung 10: Genexpression in Bezug auf das Vorliegen eines simultanen Cis (Sim. Cis -: $n=63$; Sim. Cis. +: $n=45$). Dargestellt als Box-Plots (Median, IQR, Min-Max), signifikante p -Werte sind fett gedruckt.

In Bezug auf Geschlecht, Alter, Blutgefäßinvasion und *Grading* konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden. VEGF-D zeigte keine Unterschiede in der Expression in Bezug auf die untersuchten klinischen und histopathologischen Parameter.

Tabelle 14 zeigt die Genexpression der untersuchten Gene in den tumorhaltigen Präparaten der Patientenkohorte ($>T0$; $n=108$) sowie in 6 tumorfreien Präparaten ($T0$). Die Expression der Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 ist in den tumorfreien Präparaten signifikant niedriger als in den tumortragenden Präparaten ($p=0,0001$). Bei den Lymphangiogenesemarkern VEGFR-3 und VEGF-C ist kein signifikanter Unterschied feststellbar. VEGF-D hingegen ist in den tumorfreien Präparaten signifikant höher exprimiert als in den tumortragenden Präparaten ($p=0,0001$).

Tabelle 14: Genexpression in tumorfreien ($T0$) gegenüber tumortragenden ($>T0$) Präparaten

Variable	MKI67	RACGAP1	VEGFR-3	VEGF-C	VEGF-D
$T0$ ($n=6$)	0,061 (0,037-0,111)	0,042 (0,030-0,044)	7,41 (3,379-10,07)	0,230 (0,140-0,354)	811,3 (721,1-1130)
$>T0$ ($n=108$)	0,557 (0,319-0,893)	0,134 (0,095-0,209)	6,692 (3,883-11,67)	0,182 (0,117-0,278)	113,8 (63,73-219,6)
p-Wert	<0,0001	<0,0001	0,8576	0,3690	<0,0001

Signifikante p -Werte sind fett gedruckt.

3.4 Prognostische Relevanz demographischer und klinisch-pathologischer Eigenschaften

3.4.1 Uni- und Multivariate Analyse: Rezidivfreies Überleben

In der univariaten Analyse waren hohes T-Stadium ($p=0,0042$), Lymphknotenmetastasen ($p=0,0045$) und Lymphgefäßinvasion ($p=0,0016$) signifikant mit reduziertem rezidivfreiem Überleben (RFS) assoziiert. Die Genexpression der untersuchten Marker zeigte keine Assoziation mit dem RFS (Tabelle 15).

Tabelle 15: Uni- und multivariate Analyse: RFS (Proportional Hazards Model)

Univariate Analyse RFS				Multivariate Analyse		
Variable	HR	95% CI	P-Wert	HR	95% CI	P-Wert
Geschlecht (w)	1,962	0,940-3,803	0,0712	1,339	0,561-2,973	0,4936
Alter (≥ 75)	1,193	0,624-2,216	0,5842			
pT (T3, T4)	2,684	1,400-5,480	0,0042	2,098	0,992-4,743	0,0525
pN+	3,114	1,454-6,253	0,0045	1,669	0,612-4,751	0,3185
Grading (G3)	0,809	0,436-1,546	0,5122			
LVI+	2,822	1,493-5,355	0,0016	1,888	0,719-4,580	0,1884
Sim. Cis	0,696	0,360-1,297	0,2565			
MKI67	0,917	0,480-1,868	0,8026			
RACGAP1	0,935	0,482-1,951	0,8491			
VEGFR-3	1,655	0,804-3,853	0,1800			
VEGF-C	1,232	0,611-2,751	0,5751			
VEGF-D	0,693	0,352-1,492	0,3303			

RFS=Rezidivfreies Überleben; HR=Hazard Ratio; Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

3.4.2 Uni- und Multivariate Analyse: Krankheitsspezifisches Überleben

In Bezug zum krankheitsspezifischen Überleben (DSS) waren in der univariaten Analyse die Variablen weibliches Geschlecht ($p=0,0207$), hohes T-Stadium ($p<0,0001$), Lymphknotenmetastasen ($p=0,0004$) und Lymphgefäßinvasion ($p<0,0001$) mit reduziertem DSS assoziiert. Zusätzlich war eine hohe Expression des Lymphangiogenesemarkers VEGFR-3 ($p=0,0288$; Abbildung 11) mit reduziertem DSS assoziiert. In der multivariaten Analyse waren nur hohes T-Stadium ($p=0,0171$; HR=2,619 [95% KI 1,179-6,432]) und Lymphgefäßinvasion ($p=0,008$; HR=3,394 [95% KI 1,383-8,319]) unabhängige Prognosemarker für ein reduziertes DSS (Tabelle 16).

Tabelle 16: Uni- und multivariate Analyse: DSS (Proportional Hazards Model)

Univariate Analyse DSS				Multivariate Analyse		
Variable	HR	95% CI	P-Wert	HR	95% CI	P-Wert
Geschlecht (w)	2,209	1,137 - 4,081	0,0207	0,960	0,410 - 2,125	0,9218
Alter (≥ 75)	1,159	0,622 - 2,097	0,6331			
pT (T3, T4)	3,945	1,976 - 8,764	<0,0001	2,619	1,179 - 6,432	0,0171
pN+	3,873	1,904 - 7,505	0,0004	1,214	0,498 - 3,007	0,6702
Grading (G3)	0,964	0,537 - 1,819	0,9049			
LVI+	4,634	2,521 - 8,821	<0,0001	3,394	1,384 - 8,319	0,0080
Sim. Cis	0,707	0,375 - 1,285	0,2590			
MKI67	1,262	0,649 - 2,692	0,5078			
RACGAP1	1,146	0,589 - 2,444	0,7003			
VEGFR-3	2,379	1,086 - 6,260	0,0288	1,259	0,431 - 4,562	0,6892
VEGF-C	1,015	0,530 - 2,101	0,9668			
VEGF-D	0,578	0,302 - 1,198	0,1339			

DSS=Krankheitsspezifisches Überleben; HR=Hazard Ratio; Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

3.4.3 Uni- und Multivariate Analyse: Gesamtüberleben

Die univariate Analyse in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) identifizierte folgende prognostisch signifikante klinische Parameter: Hohes T-Stadium ($p < 0,0001$), Lymphknotenmetastasen ($p < 0,0001$) und Lymphgefäßinvasion ($p < 0,0001$). Des Weiteren war eine niedrige VEGF-D-Expression ($p = 0,0069$;) signifikant mit reduziertem OS assoziiert. Hohes T-Stadium ($p = 0,0007$; HR=3,096 [95% KI 1,592-6,378]), Lymphgefäßinvasion ($p = 0,0021$; HR=3,577 [95%KI 1,618-7,718]) und niedrige VEGF-D-Expression ($p < 0,0001$; HR=0,199 [95% KI 0,095-0,425]) waren in der multivariablen Analyse unabhängige prognostische Marker für reduziertes OS (Tabelle 17).

Tabelle 17: Uni- und multivariate Analyse: OS (Proportional Hazards Model)

Univariate Analyse OS				Multivariate Analyse		
Variable	HR	95% CI	P-Wert	HR	95% CI	P-Wert
Geschlecht (w)	1,548	0,821 - 2,735	0,169			
Alter (≥ 75)	1,268	0,755 - 2,095	0,364			
pT (T3, T4)	3,206	1,826 - 5,963	<0,0001	3,096	1,593 - 6,378	0,0007
pN+	3,632	1,991 - 6,403	<0,0001	1,528	0,731 - 3,297	0,261
Grading (G3)	1,046	0,622 - 1,820	0,868			
LVI+	3,223	1,914 - 5,484	<0,0001	3,577	1,618 - 7,718	0,0021
Sim. Cis	0,818	0,482 - 1,359	0,443			
MKI67	1,287	0,729 - 2,426	0,395			
RACGAP1	1,135	0,650 - 2,100	0,667			
VEGFR-3	1,654	0,912 - 3,257	0,101			
VEGF-C	0,937	0,536 - 1,737	0,829			
VEGF-D	0,465	0,277 - 0,803	0,007	0,200	0,096 - 0,425	<0,0001

OS=Overall Survival; HR=Hazard Ratio; Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

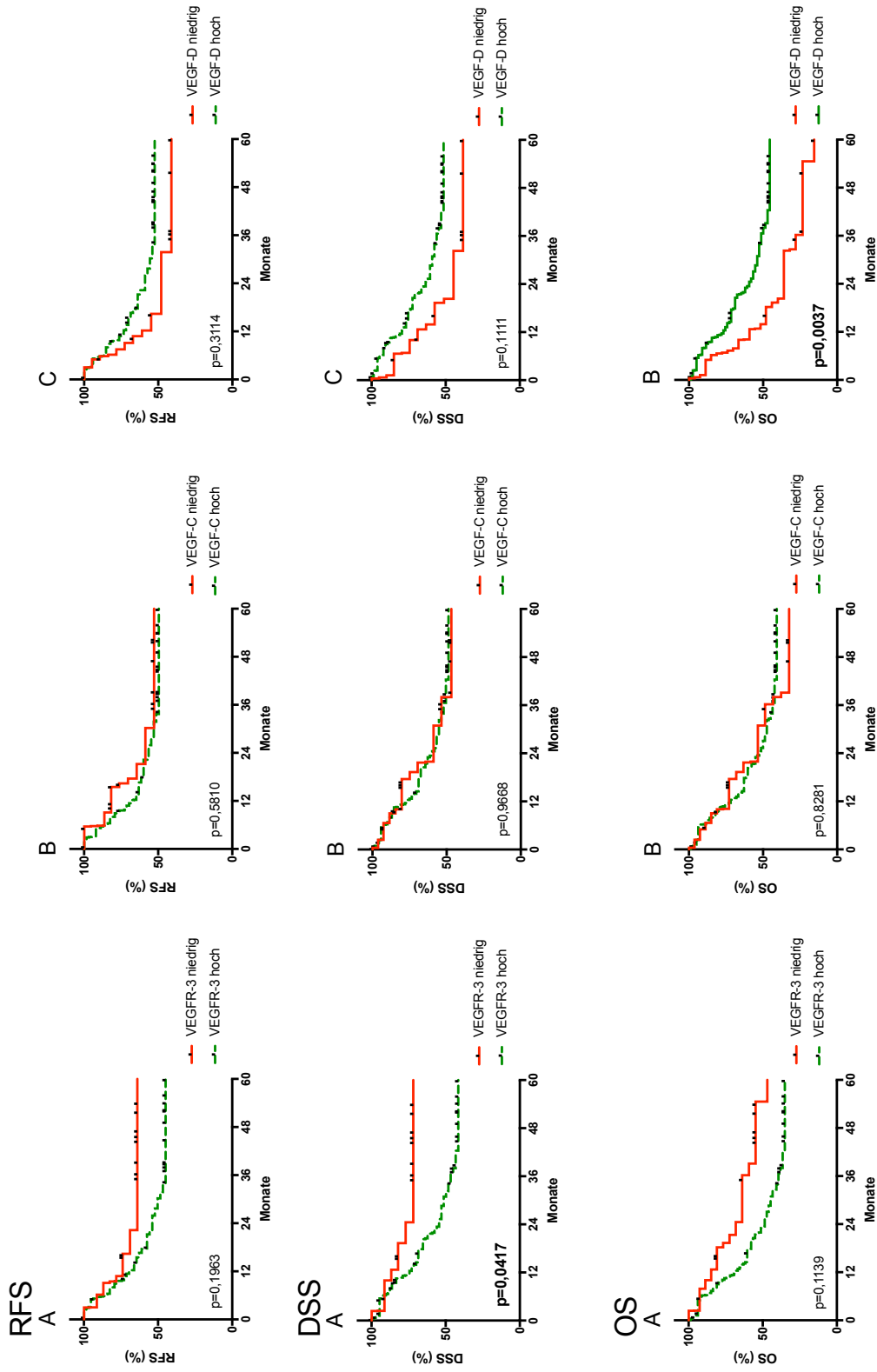


Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurven des rezidivfreien Überlebens (RFS), krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) und Gesamtüberlebens (OS) anhand der Genexpression von VEGFR-3 (A), VEGF-C (B) und VEGF-D (C). Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

3.4.4 Marker-Kombination

Zur Kombination der Markerexpression VEGFR-3 und VEGF-D wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Patientenkohorte wurde zunächst anhand der VEGF-D-Expression in zwei Gruppen geteilt. Die Gruppe, in der VEGF-D hoch exprimiert war, wurde erneut anhand der VEGFR-3-Expression in zwei Gruppen unterteilt. Die Kombination von Patienten mit hoher VEGF-D-Expression und niedriger VEGFR-3-Coexpression war mit besserem Gesamtüberleben gegenüber der Kombination aus hoher VEGF-D-Expression mit hoher VEGFR-3-Coexpression oder der alleinigen niedrigen VEGF-D-Expression assoziiert (Abbildung 12).

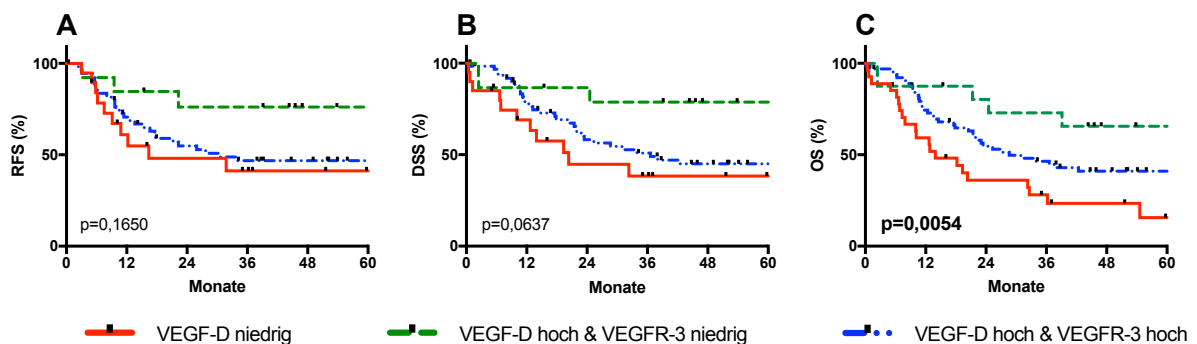


Abbildung 12: Kaplan-Meier Kurven des rezidivfreien Überlebens (A), krankheitsspezifischen Überlebens (B) und Gesamtüberlebens (C) anhand der Markerkombination von VEGF-D und VEGFR-3. Signifikante p -Werte sind fett gedruckt.

4 DISKUSSION

Trotz der Fortschritte in der chirurgischen Therapie entwickeln Patienten mit MIBC nach RZE in bis zu 50% der Fälle ein Lokalrezidiv oder Metastasen (Stein et al., 2001). Das krankheitsspezifische Überleben über fünf Jahre nach RZE beträgt über alle Tumorstadien hinweg ca. 66% (Shariat et al., 2006). Zur Einschätzung der Prognose wird in der klinischen Routine in erster Linie das TNM-Stadium, *Grading* und *Staging* herangezogen, wobei das Tumorstadium und die lymphogene Metastasierung den größten Einfluss auf die Prognose haben (Hautmann et al., 2012). Dennoch sind diese Parameter in ihrer Vorhersagekraft auf die Prognose nach RZE limitiert. Zudem wäre es wichtig, Patienten mit okkulten Metastasen bereits vor radikaler Zystektomie zu identifizieren, da damit, wie aktuelle Arbeiten zeigen (Cha et al., 2018), therapeutische Konsequenzen hinsichtlich der Durchführung einer neoadjuvanten Behandlung verbunden sein könnten. Neue molekulare Marker könnten eine genauere prognostische Risikostratifizierung, sowie prädiktive Stratifizierung hinsichtlich zielgerichteter Therapien ermöglichen. In dieser Studie wurde die mRNA-Expression der Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 sowie der Lymphangiogenesemarker VEGF-C, VEGF-D und deren Rezeptor VEGFR-3 an einer Zystektomiekohorte ermittelt und mit dem *Outcome* der Patienten nach RZE korreliert.

4.1 Lymphangiogenesemarker

Neben dem Blutgefäßsystem ist vor allem das lymphatische System für die Streuung maligner Zellen verantwortlich. Lymphknotenmetastasierung sowie Lymphgefäßinvasion sind typisch für das aggressive Harnblasenkarzinom und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Bolenz et al., 2010; Hautmann et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit war die Expression des Lymphgefäßmarkers VEGFR-3 mit hohem T-Stadium, dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und positiver Lymphgefäßinvasion assoziiert. In der univariaten Analyse war die hohe Expression von VEGFR-3 signifikant mit einem reduzierten DSS assoziiert ($p=0,0288$). Die Ergebnisse zum prognostischen Wert von VEGFR-3 decken sich weitestgehend mit den Erkenntnissen aus immunhistochemischen Studien am Urothelkarzinom. Hardenberg et al. zeigten anhand von 119 Patienten, dass die Überexpression von VEGF-D und VEGFR-3 in der univariaten Analyse signifikant mit reduziertem DSS assoziiert war. In

der Subgruppe der Lymphknoten negativen Patienten war die VEGFR-3-Überexpression ein unabhängiger Prädiktor für reduziertes RFS und DSS. Eine Korrelation von VEGFR-3 mit etablierten histopathologischen Parametern wie in der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nicht festgestellt werden (Hardenberg et al., 2014). Herrmann et al. untersuchten ebenfalls immunhistochemisch unter anderem die Marker VEGF-D und VEGFR-3 an 286 Patienten nach radikaler Zystektomie und fanden eine Korrelation mit aggressiven Tumorcharakteristika, sowie in der univariaten Analyse eine Korrelation mit reduziertem RFS (Herrmann et al., 2007). Afonso et al. stellten immunhistochemisch an 83 Zystektomiepräparaten eine starke VEGFR-3-Überexpression in nahezu allen Tumorpräparaten fest, was die statistische Analyse limitierte (Afonso et al., 2009). Die vorliegende Studie konnte eine prognostische Signifikanz von VEGFR-3 auf mRNA-Ebene zeigen. In Zusammenschau mit der vorhandenen Literatur ist anzunehmen, dass die Aktivierung von VEGFR-3 auch beim Urothelkarzinom die Ausbildung von Mikrometastasen durch Ausbildung neuer Lymphgefäße unterstützt. Die dadurch induzierte Lymphgefäßinvasion und Lymphknotenmetastasierung stellt somit einen negativen prognostischen Marker nach RZE dar. Möglicherweise könnte die Assoziation der VEGFR-3-Expression mit dem Vorliegen einer Lymphgefäßinvasion und Lymphknotenmetastasen eine Hilfe bei der Entscheidung zwischen neoadjuvanter und adjuvanter Therapie sein, sofern die Markeranalyse bereits bei der TUR-B erfolgt. Die Arbeitsgruppe Cha et al. zeigte diesbezüglich, dass Patienten mit Lymphknotenmetastasen und neoadjuvanter Therapie vor der RZE eine schlechtere Prognose hatten als Patienten mit Lymphknotenmetastasen und adjuvanter Chemotherapie nach RZE (Cha et al., 2018). Neben dem Nutzen als prognostischer Marker könnte VEGFR-3 hypothetisch auch als therapeutisches Ziel in Frage kommen. Mithilfe von löslichem VEGFR-3 Rezeptor konnten Yang et al. in einem Blasenkarzinom Mausmodell die Aktivierung von VEGFR-3 durch VEGF-C und VEGF-D blockieren, sodass die Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung reduziert wurde (Yang et al., 2011). Es existieren sowohl Inhibitoren von VEGFR-3 als auch Inhibitoren des p13K/AKT/mTor Signalweges, der sich intrazellulär einer Aktivierung von VEGFR-3 anschließt (Maira et al., 2008; McDonald, 2010). Dies zeigt, dass grundsätzlich die Möglichkeit besteht VEGFR-3 als Schlüsselmolekül der Lymphangiogenese zu blockieren. VEGF-D dient zusammen mit VEGF-C als Ligand von VEGFR-3. Daher wird VEGF-D eine erhebliche Rolle bei der Lymphangiogenese zugeschrieben (Tammela et al.,

2005). Neben anderen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom und Magenkarzinom (Jüttner et al., 2006; White et al., 2002) wurde auch beim Harnblasenkarzinom die Bedeutung von VEGF-D immunhistochemisch untersucht. Mehrere Arbeitsgruppen fanden eine Assoziation von VEGF-D mit histopathologischen Charakteristika wie dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und hohem Tumorstadium sowie reduziertem DSS in der univariaten Analyse (Hardenberg et al., 2014; Herrmann et al., 2007). In einer Studie von Benoit et al. konnte eine hohe VEGF-D Konzentration im Serum vor einer RZE signifikant das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen vorhersagen (Benoit et al., 2015). Die hier gewonnenen Ergebnisse zur VEGF-D-Expression auf mRNA-Ebene stehen interessanterweise nicht im Einklang mit diesen Erkenntnissen. Es wurde keine Korrelation mit histopathologischen Tumorcharakteristika gefunden. In Bezug auf die Prognose zeigte sich jedoch eine inverse Korrelation zwischen der VEGF-D-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten. Patienten mit hoher VEGF-D-Expression hatten sowohl in der uni- als auch in der multivariaten Analyse ein signifikant besseres Überleben als solche mit niedriger Expression. Ursächlich hierfür könnten Unterschiede in der Höhe der VEGF-D-Expression in Tumorzellen und intra- sowie peritumoralen Stromazellen sein, auf die in der vorliegenden Studie nicht eingegangen wurde. Passend dazu zeigten Donnem et al. in einer Studie am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, dass eine hohe immunhistochemische VEGF-D und VEGF-C-Expression in Stromazellen mit einer guten Prognose einhergeht, während die hohe Expression dieser Lymphangiogenesemarker in Tumorzellen mit einer schlechten Prognose korreliert (Donnem et al., 2007). Ob jedoch VEGF-D im Stroma gegenüber in Tumorzellen unterschiedliche Funktionen hat ist nicht abschließend geklärt (Donnem et al., 2007). Möglicherweise geht die hohe VEGF-D-Expression mit einer hohen peritumoralen Lymphgefäßdichte einher. Dies könnte dem Immunsystem die Bekämpfung von Tumorzellen erleichtern, was die bessere Prognose erklären könnte. Erschwerend für die Vergleichbarkeit zwischen mRNA-Expression und immunhistochemischer Proteinexpression und Funktion können auch posttranskriptionale und posttranslationale Mechanismen sein (Imamaki et al., 2018). Ebenfalls beim Bronchialkarzinom existiert eine Studie, die zeigt, dass Tumore mit Lymphknotenmetastasen eine niedrigere VEGF-D mRNA-Expression aufweisen als Tumore ohne Lymphknotenmetastasen (Niki et al., 2000). Zur Beantwortung der Frage, ob die von uns beobachtete prognostische Signifikanz von VEGF-D auf einer biologischen Funktion von VEGF-D beruht, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Die VEGF-C-Expression war in dieser Arbeit in muskelinvasiven gegenüber nicht-muskelinvasiven Tumorproben signifikant erhöht. Eine Korrelation mit klinischen Endpunkten konnten wir nicht nachweisen. Die Arbeitsgruppe um Zu et al. konnte anhand von 45 Patienten zeigen, dass die immunhistochemische VEGF-C-Überexpression mit aggressiven Tumorcharakteristika sowie in der multivariaten Analyse unabhängig mit reduziertem RFS assoziiert war (Zu et al., 2006). Herrmann et al. fanden jedoch keinerlei Assoziation von VEGF-C mit histopathologischen Parametern oder klinischem Outcome (Herrmann et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Mylona et al. kam zu einem gänzlich anderen Ergebnis. Sie fand mittels IHC anhand von 123 Patientenproben heraus, dass die VEGF-C-Überexpression invers mit Tumorstadium und Prognose korrelierte (Mylona et al., 2006). Eine Arbeit, die die mRNA-Expression von VEGF-C am Urothelkarzinom untersuchte, konnte eine positive Korrelation der VEGF-C-Expression mit der intra- und peritumoralen Lymphgefäßdichte nachweisen (Zhou et al., 2011). Die genaue Rolle von VEGF-C im VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 System beim Harnblasenkarzinom ist also nach wie vor nicht vollständig geklärt.

Interessanterweise zeigten VEGFR-3 und VEGF-C eine signifikant niedrigere Genexpression in Tumorproben mit einem simultanen Cis gegenüber Proben ohne einem simultanen Cis. Beim NMIBC ist das Vorhandensein eines simultanen Cis ein wichtiger Risikofaktor für einen Tumorprogress (Bolenz et al., 2013; Shariat et al., 2007). In der Arbeit von Hardenberg et al. war die Überexpression von VEGF-C, nicht aber VEGFR-3, mit dem Vorhandensein eines simultanen Cis assoziiert (Hardenberg et al., 2014). In unserer Studie hatte das Vorhandensein eines simultanen Cis keinen Einfluss auf die Prognose. Die Unterschiede in der Genexpression von VEGFR-3 und VEGF-C könnten neben unbekanntem biologischen Effekten zusätzlich durch *Confounder* wie einer ungleichen Verteilung von Tumorstadien und Lymphknotenstatus unter den Gruppen mit und ohne einem simultanen Cis zustande kommen.

In den tumorfreien Patientenproben waren die Gene VEGFR-3 und VEGF-C etwa gleich hoch exprimiert wie in den tumorhaltigen Proben. VEGF-D war in den tumorfreien Proben sogar deutlich höher exprimiert als in den tumorhaltigen Proben. Unter der Annahme, dass die Expression dieser Gene mit der Lymphgefäßdichte korreliert, könnten Unterschiede in der Lymphgefäßdichte zwischen tumortragenden und tumorfreien Präparaten hierfür eine Erklärung bieten. Bolenz et al. beschrieben, dass die peri- und nontumorale Lymphgefäßdichte ca. 4 mal höher war als die intratumorale

Lymphgefäßdichte (Bolenz et al., 2013). Auch bei anderen Entitäten, wie dem Kopf-Hals Karzinom oder dem Adenokarzinom der Lunge existieren Studien, die ebenfalls eine erhöhte VEGF-D-Expression im Normalgewebe gegenüber korrespondierendem Tumorgewebe oder Lymphknotenmetastasen zeigen (Niki et al., 2000; O-Charoenrat et al., 2001).

Diese kontroversen Erkenntnisse machen die Komplexität des VEGFR-3/VEGF-C/VEGF-D Systems deutlich und zeigen einen weiterhin bestehenden Forschungsbedarf auf.

4.2 Proliferationsmarker

Bereits mehrere Studien zeigen, dass MKI67 zur Risikostratifizierung des Harnblasenkarzinoms geeignet ist. Insbesondere beim NMIBC konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen (sowohl durch IHC als auch durch mRNA-Expressionsanalysen), dass die MKI67-Expression mit den klassischen histopathologischen Parametern *Grading* und T-Stadium einhergeht (Breyer et al., 2016; Ding et al., 2014). In der hier durchgeführten Arbeit korrelierte die Expression der Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 streng miteinander. Dies spricht für die Qualität der Methode und die der Marker, da beide Marker biologisch unabhängig voneinander die Proliferation im Gewebe abbilden sollten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die MKI67-Expression im MIBC gegenüber dem NMIBC signifikant erhöht waren. Des Weiteren war die Expression in tumorhaltigen Proben deutlich gegenüber tumorfreien Proben erhöht. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Margulis et al. und Wang et al., die die immunhistochemische Ki67-Expression an Zystektomiekohorten untersucht haben (Margulis et al., 2006; Wang et al., 2016). Sie fanden heraus, dass die Ki67-Überexpression mit hohem T-Stadium, *Grading* und LVI assoziiert ist. Goyal et al. konnten zeigen, dass ein hoher *Ki67-Labeling Index* ein potentieller Indikator für Muskelinvasion ist (Goyal et al., 2014). Tumore mit Muskelinvasion scheinen also eine höhere Proliferationsrate zu haben, als nicht-muskelinvasive Tumore. Eine andere Untersuchung zeigte hingegen, dass im Urothelkarzinom des oberen Harntrakts eine niedrige Ki67-Expression ein unabhängiger Risikofaktor für ein Rezidiv des Urothelkarzinoms ist. Einschränkend muss hier bemerkt werden, dass das Urothelkarzinom des oberen Harntrakts, obwohl dem Urothelkarzinom der Blase sehr ähnlich, eine eigene Entität darstellt und mit diesem nur bedingt vergleichbar ist (Wu et al., 2015). Margulis et al. fanden außerdem

eine signifikante Assoziation der Ki67-Überexpression mit positiver Lymphknotenmetastasierung, welche hier nicht nachgewiesen werden konnte. Andere Arbeitsgruppen konnten an Zystektomiekohorten durch immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass eine Überexpression von Ki67 mit einem schlechteren Outcome einhergeht (Lotan et al., 2013; Margulis et al., 2009; Wang et al., 2016).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die MKI67-Expression in G3 Tumoren höher als in der Gruppe der G1/G2 Tumore ist. Dies bestätigt Ergebnisse von Breyer et al. auf mRNA-Ebene beim NMIBC und Margulis et al. mittels IHC beim MIBC, die ebenfalls eine Korrelation von MKI67 mit hohem *Grading* herausfanden (Breyer et al., 2016; Margulis et al., 2009).

Die zusätzliche Bestimmung von MKI67 auf mRNA-Ebene könnte demnach eine objektive Hilfe zur Einschätzung des *Gradings* auf molekularer Ebene darstellen, insbesondere, da die Bestimmung des *Gradings* beim Harnblasenkarzinom einer gewissen Untersucherabhängigkeit unterliegt (Babjuk et al., 2013; Engers, 2007).

Die klinische Signifikanz der RACGAP1-Überexpression wurde in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen, darunter Magenkrebs, kolorektales Karzinom, Brustkrebs, hepatozelluläres Karzinom und Meningeom (Imaoka et al., 2014). In der hier präsentierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die RACGAP1-Expression in tumorhaltigen Proben gegenüber den tumorfreien Kontrollen signifikant erhöht war. Des Weiteren korrelierte die Expression signifikant mit dem Tumorstadium. Eine Korrelation von RACGAP1 mit klinischen Endpunkten konnte nicht gezeigt werden.

Eine Studie, die die Genexpression von RACGAP1 am Urothelkarzinom untersucht, konnte im Mausmodell und an Tumorpräparaten nicht-muskelinvasiver Urothelkarzinome zeigen, dass RACGAP1 bereits in niedrigen Tumorstadien stark exprimiert ist (Stone II et al., 2010). Beim kolorektalen Karzinom beispielsweise war in einer Studie die hohe nukleäre RACGAP1 Protein- sowie mRNA-Expression ein unabhängiger Marker für Lymphknotenmetastasierung und schlechtere Prognose (Imaoka et al., 2014). Ebenfalls am kolorektalen Karzinom wurde immunhistochemisch die Rolle der nukleären mit der cytoplasmatischen RACGAP1-Expression verglichen. Die Prognose der Patienten verhielt sich gegensätzlich je nach Ort der RACGAP1-Expression: Patienten mit hoher cytoplasmatischer RACGAP1-Expression hatten einen Überlebensvorteil, Patienten mit hoher nukleärer RACGAP1-Expression hingegen eine schlechtere Prognose (Yeh et al., 2016). Zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Expres-

sion wurde in der vorliegenden Studie nicht unterschieden, da die Expression im gesamten Tumorgewebe bestimmt wurde. Beim Mammakarzinom existieren Hinweise auf einen starken prognostischen Nutzen der mRNA-Expression von RACGAP1, der die Aussagekraft etablierter Proliferationsmarker wie Ki67 sogar übertrifft (Kotoula et al., 2013; Milde-Langosch et al., 2013; Pliarchopoulou et al., 2013).

4.3 Methodik und Limitationen

Die Methode der mRNA-Expressionsanalyse anhand von FFPE-Gewebe bietet die Möglichkeit große Kohorten retrospektiv zu untersuchen. Vorteile gegenüber immunhistochemischen Färbungen, die einer gewissen Inter- und Intraobserver-Variabilität unterliegen (Varga et al., 2012), sind die Objektivität in der Interpretation und die einfache Standardisierbarkeit in der Durchführung der Analyse.

Dennoch hat die Methode der mRNA-Expressionsanalyse Limitationen. Es existiert insbesondere beim Urothelkarzinom nur wenig Literatur über geeignete Referenzgene zur Normalisierung der Rohdaten. In dieser Studie verwendeten wir das Housekeeping Gen Ribosomal Protein L37a, kurz RPL37A. Es ist Teil der 60S Untereinheit des Ribosoms, welches die Proteinsynthese katalysiert und daher konstitutiv exprimiert wird. In einer Studie zeigt es sich unabhängig von der Lagerungsdauer und Tumorzellgehalt der FFPE-Präparate gleichmäßig exprimiert (Tramm et al., 2013a). RPL37A wird vielfach und erfolgreich als Referenzgen zum Beispiel bei mRNA-Expressionsstudien des Mammakarzinoms verwendet.

Die Bedeutung des variierenden Tumoranteils im Gewebepräparat zwischen verschiedenen Gewebepräparaten für die mRNA-Expressionsanalyse ist noch nicht vollständig verstanden und muss weiter evaluiert werden. Der verwendete Mindesttumoranteil zur RNA-Extraktion variiert in verschiedenen Studien zwischen 10% und 70% (Kotoula et al., 2013). Darüber hinaus wird in der Literatur der Begriff des Tumoranteils unterschiedlich verwendet. Teils wird unter dem Begriff des Tumoranteils der Tumorzellgehalt angegeben, welcher ausschließlich die epitheliale Tumorkomponente beinhaltet und teils der Tumoranteil, welcher epitheliale Tumorzellen zusammen mit Tumorstroma beinhaltet. Es existieren aber auch Arbeiten, die zeigen, dass sogar bei einem geringen Tumoranteil von bis zu 10% eine reliable Quantifizierung der mRNA-Expression möglich ist und somit benachbartes nicht-neoplastisches Gewebe vernachlässigbar sein könnte (Poremba et al., 2014; Tramm et al., 2013b). Andere Genexpressions-

tests wie der Prosigna PAM50 Test werden in ihrem Ergebnis von benachbartem gesunden Gewebe beeinflusst, sodass hier der Tumorzellgehalt erhöht werden muss, um ein reliables Ergebnis zu erhalten (Elloumi et al., 2011). Zur Klärung des Einflusses von nicht-neoplastischem Normalgewebe auf die mRNA-Expression der verwendeten Marker sind weitere vergleichende Untersuchungen beispielsweise mit Mikrodissektion durchaus sinnvoll. Einflüsse posttranskriptionaler Modifikationen der Marker-mRNA, die die Translation zum Protein beeinflussen, sollten ebenfalls eingehend aufgearbeitet werden.

Limitierend sind in der hier dargestellten Studie darüber hinaus das retrospektive Design und eine mögliche Verzerrung bei der Erhebung der *Follow-Up* Daten. Darüber hinaus ist die statistische Power der Studie aufgrund der Größe der Kohorte begrenzt, insbesondere bei der Betrachtung von Subgruppen. Eine weitere Limitation, welche die Ergebnisqualität einschränkt, ist das nicht vollständige *Follow-Up* bei einem Teil der Patienten. Dennoch kann diese Studie zur weiteren Entwicklung von Biomarkern beim Urothelkarzinom beitragen. Externe, sowie prospektive Validierungen der verwendeten Biomarker auf mRNA-Ebene sowie zusätzlich immunhistochemischer Basis sind für ein abschließendes Urteil nötig.

4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde Tumorgewebe einer Patientenkohorte nach radikaler Zystektomie aufgrund eines Urothelkarzinoms der Harnblase mittels Genexpressionsanalyse untersucht. Es zeigte sich eine Assoziation der Expression von MKI67, RACGAP1, VEGFR-3, VEGF-C mit höheren T-Stadien und von MKI67 mit *high-grade* (G3) Tumoren. VEGFR-3 war neben Lymphknotenmetastasen und Lymphgefäßinvasion auch mit dem krankheitsspezifischen Überleben im univariaten Modell assoziiert. Als unabhängige Prädiktoren für ein reduziertes Gesamtüberleben konnten ein hohes T-Stadium und Lymphgefäßinvasion, sowie eine niedrige VEGF-D-Expression identifiziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Lymphangiogenemarker wie VEGFR-3 auch beim Harnblasenkarzinom eine Rolle bei der lymphogenen Mikrometastasierung spielen. Zudem stellen sie einen Baustein zur objektiven Risikostratifizierung nach radikaler Zystektomie dar. Die gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Expression von VEGF-D zeigen den weiter bestehenden Forschungsbedarf an. Die mRNA-Genexpressionsanalyse von Proliferationsmarkern wie MKI67 könnte im Sinne eines molekularen *Gradings* in Betracht gezogen werden. Um das

Potential der Untersuchung von MKI67 auf mRNA-Ebene als Ergänzung zur Immunhistochemie besser beurteilen zu können, sind weitere Forschungsprojekte nötig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die lymphogene Metastasierung und Tumorproliferation sind für den Verlauf des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase nach radikaler Operation und multimodaler Therapie von entscheidender Bedeutung für Rezidive und Mortalität. Eine lymphogene Mikrometastasierung zum Operationszeitpunkt ist ein wichtiger Risikofaktor und macht Schwierigkeiten in der perioperativen Diagnostik. In dieser Arbeit wurde daher die Genexpression von *Marker of Proliferation Ki67* (MKI67), *Rac GTPase Activating Protein 1* (RACGAP1), *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3* (VEGFR-3), *Vascular Endothelial Growth Factor-C* (VEGF-C) und *Vascular Endothelial Growth Factor-D* (VEGF-D) mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion an repräsentativen Tumorschnitten von 108 Patienten nach radikaler Zystektomie untersucht. Die Genexpression wurde mit klinischen und histopathologischen Parametern korreliert und die Bedeutung für den weiteren Krankheitsverlauf der Patienten in uni- und multivariaten Analysen herausgearbeitet. Die Expression von MKI67, RACGAP1, VEGFR-3, VEGF-C war signifikant mit höheren T-Stadien assoziiert. MKI67 war in *high-grade* (G3) Tumoren signifikant höher exprimiert als in *low-grade* (G1/G2) Tumoren. Die VEGFR-3-Expression war signifikant mit dem Vorhandensein einer Lymphgefäßinvasion und Lymphknotenmetastasen assoziiert. VEGFR-3 war in der univariaten Analyse signifikant mit einem reduzierten krankheitsspezifischen Überleben assoziiert. Die multivariate Analyse identifizierte sowohl das T-Stadium als auch Lymphgefäßinvasion als unabhängige Prädiktoren für ein reduziertes krankheitsspezifisches Überleben. Als unabhängige Prädiktoren für ein reduziertes Gesamtüberleben konnten ein hohes T-Stadium und Lymphgefäßinvasion, sowie eine niedrige VEGF-D-Expression identifiziert werden. Die Proliferationsmarker MKI67 und RACGAP1 sowie VEGF-C waren ohne prognostische Relevanz. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Möglichkeit eines molekularen *Gradings* bzw. der *Target*-spezifischen Risikostratifizierung zur Analyse der lymphogenen Mikrometastasierung nach radikaler Zystektomie auf.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Achen, M.G., McColl, B.K., and Stacker, S.A. (2005). Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 7, 121–127.

Afonso, J., Santos, L.L., Amaro, T., Lobo, F., and Longatto-Filho, A. (2009). The aggressiveness of urothelial carcinoma depends to a large extent on lymphovascular invasion - The prognostic contribution of related molecular markers. *Histopathology* 55, 514–524.

Amin, M.B., Trpkov, K., Lopez-Beltran, A., and Grignon, D. (2014). Best Practices Recommendations in the Application of Immunohistochemistry in the Bladder Lesions. *Am J Surg Pathol* 38, e20–e34.

Antoni, S., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Znaor, A., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol* 71, 96–108.

Babjuk, M., Burger, M., Zigeuner, R., Shariat, S.F., Van Rhijn, B.W.G., Compérat, E., Sylvester, R.J., Kaasinen, E., Böhle, A., Palou Redorta, J., et al. (2013). EAU guidelines on non-muscle-invasive Urothelial carcinoma of the bladder: Update 2013. *Eur Urol* 64, 639–653.

Bellmunt, J., and Petrylak, D. (2012). New Therapeutic Challenges in Advanced Bladder Cancer. *Semin Oncol* 39, 598–607.

Bellmunt, J., de Wit, R., Vaughn, D.J., Fradet, Y., Lee, J.-L., Fong, L., Vogelzang, N.J., Climent, M.A., Petrylak, D.P., Choueiri, T.K., et al. (2017). Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 376, 1015–1026.

Benoit, T., Keller, E.X., Wolfsgruber, P., Hermanns, T., Gunthart, M., Banzola, I., Sulser, T., Provenzano, M., and Poyet, C. (2015). High VEGF-D and Low MMP-2 Serum Levels Predict Nodal-Positive Disease in Invasive Bladder Cancer. *Med Sci Monit* 21, 2266–2274.

Bolenz, C., and Lotan, Y. (2008). Molecular biomarkers for urothelial carcinoma of the bladder: challenges in clinical use. *Nat Clin Pract Urol* 5, 676–685.

Bolenz, C., Herrmann, E., Bastian, P.J., Michel, M.S., Wülfing, C., Tiemann, A., Buchner, A., Stief, C.G., Fritsche, H.M., Burger, M., et al. (2010). Lymphovascular invasion is an independent predictor of oncological outcomes in patients with lymph node-negative urothelial bladder cancer treated by radical cystectomy: A multicentre validation trial. *BJU Int* 106, 493–499.

Bolenz, C., Auer, M., Ströbel, P., Heinzlbecker, J., Schubert, C., and Trojan, L. (2013). The lymphatic system in clinically localized urothelial carcinoma of the bladder: Morphologic characteristics and predictive value. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 31, 1606–1614.

Breyer, J., Wirtz, R.M., Laible, M., Schlombs, K., Erben, P., Kriegmair, M.C., Stoehr, R., Eidt, S., Denzinger, S., Burger, M., et al. (2016). ESR1, ERBB2, and Ki67 mRNA expression predicts stage and grade of non-muscle-invasive bladder carcinoma (NMIBC). *Virchows Arch* 469, 547–552.

Bubendorf, L., Sauter, G., Moch, H., Schmid, H.P., Gasser, T.C., Jordan, P., and Mihatsch, M.J. (1996). Ki67 labelling index: An independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol* 178, 437–441.

Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 206, 624–635.

Cha, E.K., Sfakianos, J.P., Sukhu, R., Yee, A.M., Sjoberg, D.D., and Bochner, B.H. (2018). Poor prognosis of bladder cancer patients with occult lymph node metastases treated with neoadjuvant chemotherapy. 627–632.

Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E.R., Hoffman-Censits, J., Roth, B., Cheng, T., Tran, M., Lee, I.L., et al. (2014). Identification of Distinct Basal and Luminal

Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* 25, 152–165.

Chrouser, K., Leibovich, B., Bergstralh, E., and Zincke, H. (2005). Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *174*, 107–111.

Culine, S., Theodore, C., De Santis, M., Bui, B., Demkow, T., Lorenz, J., Rolland, F., Delgado, F.M., Longerey, B., and James, N. (2006). A phase II study of vinflunine in bladder cancer patients progressing after first-line platinum-containing regimen. *Br J Cancer* 94, 1395–1401.

Damrauer, J.S., Hoadley, K.A., Chism, D.D., Fan, C., Tiganelli, C.J., Wobker, S.E., Yeh, J.J., Milowsky, M.I., Iyer, G., Parker, J.S., et al. (2014). Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111.

Ding, W., Gou, Y., Sun, C., Xia, G., Wang, H., Chen, Z., Tan, J., Xu, K., and Qiang, D. (2014). Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); Combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 32, 42.e13-42.e19.

Donnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Delghandi, M.P., Persson, M., Nilsen, M.N., Busund, L.T., and Bremnes, R.M. (2007). Inverse prognostic impact of angiogenic marker expression in tumor cells versus stromal cells in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13, 6649–6657.

Elloumi, F., Hu, Z., Li, Y., Parker, J.S., Gulley, M.L., Amos, K.D., and Troester, M.A. (2011). Systematic bias in genomic classification due to contaminating non-neoplastic tissue in breast tumor samples. *BMC Med Genomics* 4, 54.

Engers, R. (2007). Reproducibility and reliability of tumor grading in urological neoplasms. *World J Urol* 25, 595–605.

Fairchild, W. V, Spence, C.R., Solomon, H.D., and Gangai, M.P. (1979). The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *J Urol* 122, 163–164.

Freedman, N.D., Silverman, D.T., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., and Abnet, C.C. (2011). Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama* 306, 737–745.

Garcia-Closas, M., Rothman, N., Figueroa, J., Prokunina-Olsson, L., Han, S., Baris, D., Jacobs, E., Malats, N., De Vivo, I., Albanes, D., et al. (2014). Common genetic polymorphisms modify the effect of smoking on absolute risk of bladder cancer. *NIH Public Access* 73, 2211–2220.

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

Goyal, S., Singh, U.R., Sharma, S., and Kaur, N. (2014). Correlation of mitotic indices, AgNor count, Ki-67 and Bcl-2 with grade and stage in papillary urothelial bladder cancer. *Urol J* 11, 1238–1247.

Hardenberg, J. von, Martini, T., Knauer, A., Ströbel, P., Becker, A., Herrmann, E., Schubert, C., Steidler, A., and Bolenz, C. (2014). Expression and predictive value of lymph-specific markers in urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 32, 54.e9-54.e17.

Hautmann, R.E., De Petriconi, R.C., Pfeiffer, C., and Volkmer, B.G. (2012). Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder without neoadjuvant or adjuvant therapy: Long-term results in 1100 patients. *Eur Urol* 61, 1039–1047.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19.

Herrmann, E., Eltze, E., Bierer, S., Köpke, T., Gorge, T., Neumann, J., Hertle, L., and

Wülfing, C. (2007). VEGF-C, VEGF-D and Flt-4 in transitional bladder cancer: Relationships to clinicopathological parameters and long-term survival. *Anticancer Res* 27, 3127–3133.

Ho, P.L., Kurtova, A., and Chan, K.S. (2012). Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *9*, 583–594.

Imamaki, R., Ogawa, K., Kizuka, Y., Komi, Y., Kojima, S., Kotani, N., Honke, K., Honda, T., Taniguchi, N., and Kitazume, S. (2018). Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2- $\beta 3$ integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis. *Oncogene* 37, 4287–4299.

Imaoka, H., Toiyama, Y., Saigusa, S., Kawamura, M., Kawamoto, A., Okugawa, Y., Hiro, J., Tanaka, K., Inoue, Y., Mohri, Y., et al. (2014). RacGAP1 expression, increasing tumor malignant potential, as a predictive biomarker for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 36, 346–354.

Jacquemet, G., Green, D.M., Bridgewater, R.E., Kriegsheim, A. von, Humphries, M.J., Norman, J.C., and Caswell, P.T. (2013). Rcp-driven $\alpha 5\beta 1$ recycling suppresses rac and promotes rhoa activity via the racgap1-iqgap1 complex. *J Cell Biol* 202, 917–935.

Jüttner, S., Wißmann, C., Jöns, T., Vieth, M., Hertel, J., Gretschel, S., Schlag, P.M., Kemmner, W., and Höcker, M. (2006). Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: Two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 24, 228–240.

Kamat, A.M., Hahn, N.M., Efstathiou, J.A., Lerner, S.P., Malmström, P.U., Choi, W., Guo, C.C., Lotan, Y., and Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *Lancet* 388, 2796–2810.

Kantor, A.F., Hartge, P., Hoover, R.N., and Fraumeni, J.F. (1988). Epidemiological Characteristics of Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Bladder. *Epidemiological Characteristics of the Bladder of Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma. Cancer Res* 48, 3853–3855.

Kawashima, T., Bao, Y.C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., Fukagawa, T., Fukada, T., Takahashi, N., Nosaka, T., et al. (2009). A Rac GTPase-activating protein, MgcRacGAP, is a nuclear localizing signal-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. *Mol Cell Biol* 29, 1796–1813.

Knowles, M.A., and Hurst, C.D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Publ Gr* 15, 25–41.

Kotoula, V., Kalogeras, K.T., Kouvatsas, G., Televantou, D., Kronenwett, R., Wirtz, R.M., and Fountzilias, G. (2013). Sample parameters affecting the clinical relevance of RNA biomarkers in translational breast cancer research. *Virchows Arch* 462, 141–154.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF) (2016). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0, 2016, AWMF-Registernummer: 032/038OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/>.

Linardou, H., Kalogeras, K.T., Kronenwett, R., Kouvatsas, G., Wirtz, R.M., Zagouri, F., Gogas, H., Christodoulou, C., Koutras, A.K., Samantas, E., et al. (2012). The prognostic and predictive value of mRNA expression of vascular endothelial growth factor family members in breast cancer: a study in primary tumors of high-risk early breast cancer patients participating in a randomized Hellenic Cooperative Oncology G. *Breast Cancer Res* 14, R145.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.

Lotan, Y., Gupta, A., Shariat, S.F., Palapattu, G.S., Vazina, A., Karakiewicz, P.I., Bastian, P.J., Rogers, C.G., Amiel, G., Perotte, P., et al. (2005). Lymphovascular invasion is independently associated with overall survival, cause-specific survival, and local and distant recurrence in patients with negative lymph nodes at radical cystectomy. *J Clin Oncol* 23, 6533–6539.

Lotan, Y., Bagrodia, A., Passoni, N., Rachakonda, V., Kapur, P., Arriaga, Y., Bolenz, C., Margulis, V., Raj, G. V., Sagalowsky, A.I., et al. (2013). Prospective Evaluation of a Molecular Marker Panel for Prediction of Recurrence and Cancer-specific Survival After Radical Cystectomy. *Eur Urol* 64, 465–471.

Von Der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J.T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M.J., Zimmermann, A., and Arning, M. (2005). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 23, 4602–4608.

Maira, S.-M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chène, P., De Pover, A., Schoemaker, K., et al. (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7, 1851–1863.

Margulis, V., Shariat, S.F., Ashfaq, R., Sagalowsky, A.I., and Lotan, Y. (2006). Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. *Clin Cancer Res* 12, 7369–7373.

Margulis, V., Lotan, Y., Karakiewicz, P.I., Fradet, Y., Ashfaq, R., Capitanio, U., Montorsi, F., Bastian, P.J., Nielsen, M.E., Müller, S.C., et al. (2009). Multi-institutional validation of the predictive value of ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 114–119.

McDonald, D. (2010). New Antibody to Stop Tumor Angiogenesis and Lymphatic Spread by Blocking Receptor Partnering. *Cancer Cell* 18, 541–543.

Meeks, J.J., Bellmunt, J., Bochner, B.H., Clarke, N.W., Daneshmand, S., Galsky, M.D., Hahn, N.M., Lerner, S.P., Mason, M., Powles, T., et al. (2012). A systematic review of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 62, 523–533.

Milde-Langosch, K., Karn, T., Müller, V., Witzel, I., Rody, A., Schmidt, M., and Wirtz,

R.M. (2013). Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137, 57–67.

Molen, A.J., Cowan, N.C., Mueller-Lisse, U.G., Nolte-Ernsting, C.C.A., Takahashi, S., and Cohan, R.H. (2008). CT urography: Definition, indications and techniques. A guideline for clinical practice. *Eur Radiol* 18, 4–17.

Morrison, C.D., Liu, P., Woloszynska-Read, A., Zhang, J., Luo, W., Qin, M., Bshara, W., Conroy, J.M., Sabatini, L., Vedell, P., et al. (2014). Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E672-81.

Murta-Nascimento, C., Silverman, D.T., Kogevinas, M., Garcia-Closas, M., Rothman, N., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Villanueva, C., et al. (2007). Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1595–1600.

Mylona, E., Magkou, C., Gorantonakis, G., Giannopoulou, I., Nomikos, A., Zarogiannos, A., Zervas, A., and Nakopoulou, L. (2006). Evaluation of the vascular endothelial growth factor (VEGF)-C role in urothelial carcinomas of the bladder. *Anticancer Res* 26, 3567–3571.

Nielsen, M.E., Palapattu, G.S., Karakiewicz, P.I., Lotan, Y., Bastian, P.J., Lerner, S.P., Sagalowsky, A.I., Schoenberg, M.P., and Shariat, S.F. (2007). A delay in radical cystectomy of >3 months is not associated with a worse clinical outcome. *BJU Int* 100, 1015–1020.

Niki, T., Iba, S., Tokunou, M., Yamada, T., Matsuno, Y., and Hirohashi, S. (2000). Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 6, 2431–2439.

O-Charoenrat, P., Rhys-Evans, P., and Eccles, S.A. (2001). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Family Members in Head and Neck Squamous Cell

Carcinoma Correlates with Lymph Node Metastasis. *Cancer* 92, 556–568.

Otto, W., Denzinger, S., Fritsche, H.M., Burger, M., Wieland, W.F., Hofstädter, F., Hartmann, A., and Bertz, S. (2011). The WHO classification of 1973 is more suitable than the WHO classification of 2004 for predicting survival in pT1 urothelial bladder cancer. *BJU Int* 107, 404–408.

Otto, W., May, M., Fritsche, H., Dragun, D., Aziz, A., Gierth, M., Trojan, L., Herrmann, E., Moritz, R., Ellinger, J., et al. (2012). Analysis of Sex Differences in Cancer-Specific Survival and Perioperative Mortality Following Radical Cystectomy : Results of a Large German Multicenter Study of Nearly 2500 Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder. *GENM* 9, 481–489.

Pashos, C.L., and Botteman, M.F. (2002). Bladder Cancer Epidemiology, Diagnosis and Management. *10*, 311–323.

Pfaffl, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In *A-Z of Quantitative PCR*, S.A. Bustin, ed. (La Jolla, CA: International University Line), pp. 87–112.

Pliarchopoulou, K., Kalogeras, K.T., Kronenwett, R., Wirtz, R.M., Eleftheraki, A.G., Batistatou, A., Bobos, M., Soupos, N., Polychronidou, G., Gogas, H., et al. (2013). Prognostic significance of RACGAP1 mRNA expression in high-risk early breast cancer : a study in primary tumors of breast cancer patients participating in a randomized Hellenic Cooperative Oncology Group trial. 245–255.

Ploeg, M., Aben, K.K.H., and Kiemeny, L.A. (2009). The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 27, 289–293.

Poremba, C., Uhlendorff, J., Pfitzner, B.M., Hennig, G., Bohmann, K., Bojar, H., Krenn, V., Brase, J.C., Haufe, F., Averdick, M., et al. (2014). Preanalytical variables and performance of diagnostic RNA-based gene expression analysis in breast cancer. *Virchows Arch* 465, 409–417.

Prout, G.R., and Marshall, V.F. (1956). The Prognosis with untreated Bladder Tumors.

Cancer 9, 551–558.

Raitanen, M.P., Aine, R., Rintala, E., Kallio, J., Rajala, P., Juusela, H., and Tammela, T.L.J. (2002). Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol* 41, 284–289.

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2017). Krebs in Deutschland für 2013 / 2014. 11. Ausgabe.

Rosenberg, J.E., Hoffman-Censits, J., Powles, T., Van Der Heijden, M.S., Balar, A. V, Necchi, A., Dawson, N., O'Donnell, P.H., Balmanoukian, A., Loriot, Y., et al. (2016). Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 387, 1909–1920.

Saharinen, P., Tammela, T., Karkkainen, M.J., and Alitalo, K. (2004). Lymphatic vasculature: Development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 25, 387–395.

Salameh, A., Galvagni, F., Bardelli, M., Bussolino, F., and Oliviero, S. (2005). Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT and JNK pathways. *Blood* 106, 3423–3431.

Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol* 322, 311–322.

Shariat, S.F., Karakiewicz, P.I., Palapattu, G.S., Lotan, Y., Rogers, C.G., Amiel, G.E., Vazina, A., Gupta, A., Bastian, P.J., Sagalowsky, A.I., et al. (2006). Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: A contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. *J Urol* 176, 2414–2422.

Shariat, S.F., Palapattu, G.S., Karakiewicz, P.I., Rogers, C.G., Vazina, A., Bastian, P.J., Schoenberg, M.P., Lerner, S.P., Sagalowsky, A.I., and Lotan, Y. (2007).

Concomitant Carcinoma In Situ Is a Feature of Aggressive Disease in Patients With Organ-Confined TCC at Radical Cystectomy. *Eur Urol* 51, 152–160.

Slack, J.L., Bi, W., Livak, K.J., Beaubier, N., Yu, M., Clark, M., Kim, S.H., Gallagher, R.E., and Willman, C.L. (2001). Pre-clinical validation of a novel, highly sensitive assay to detect PML-RAR alpha mRNA using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 3, 141–149.

Sleeman, J.P., and Thiele, W. (2009). Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int J Cancer* 125, 2747–2756.

Sobin, L., Gospodarowicz, M., and Wittekind, C. (2009). TNM classification of malignant tumors (Oxford: Wiley-Blackwell).

Stacker, S.A., Achen, M.G., Jussila, L., Baldwin, M.E., and Alitalo, K. (2002). Lymphangiogenesis and Cancer Metastasis. *Nat Rev Cancer* 2, 573–583.

Stein, B.J.P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., et al. (2001). Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer : Long-Term Results in 1,054 Patients. *19*, 666–675.

Stone II, R., Sabichi, A.L., Gill, J., Lee, I., Adegboyega, P., and Dai, M.S. (2010). Identification of Genes Correlated with Early-Stage Bladder Cancer Progression. *Cancer Prev Res* 3, 776–787.

Sylvester, R.J., Van Der Meijden, A.P.M., Oosterlinck, W., Witjes, J.A., Bouffieux, C., Denis, L., Newling, D.W.W., and Kurth, K. (2006). 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* 49, 466–475.

Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., and Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65, 550–563.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma. *Nature* 507, 315–322.

Tramm, T., Sørensen, B.S., Overgaard, J., and Alsner, J. (2013a). Optimal Reference Genes for Normalization of qRT-PCR Breast Tumors Controlling for Tumor Cell Content and Decay of mRNA. *Diagnostic Mol Pathol* 22, 181–187.

Tramm, T., Hennig, G., Kyndi, M., Alsner, J., Sørensen, F.B., Myhre, S., Sørli, T., and Overgaard, J. (2013b). Reliable PCR quantitation of estrogen, progesterone and ERBB2 receptor mRNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue is independent of prior macro-dissection. *Virchows Arch* 463, 775–786.

Varga, Z., Diebold, J., Dommann-Scherrer, C., Frick, H., Kaup, D., Noske, A., Obermann, E., Ohlschlegel, C., Padberg, B., Rakozy, C., et al. (2012). How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss working group of breast- and gynecopathologists. *PLoS One* 7, 1–12.

Walch, A., Specht, K., Smida, J., Aubele, M., Zitzelsberger, H., Höfler, H., and Werner, M. (2001). Tissue microdissection techniques in quantitative genome and gene expression analyses. *Histochem Cell Biol* 115, 269–276.

Wang, L., Zhou, M., Feng, C., Gao, P., Ding, G., Zhou, Z., Jiang, H., Wu, Z., and Ding, Q. (2016). Prognostic value of Ki67 and p63 expressions in bladder cancer patients who underwent radical cystectomy. *Int Urol Nephrol* 48, 495–501.

Wang, S.M., Ooi, L.L.P.J., and Hui, K.M. (2011). Upregulation of Rac GTPase-activating protein 1 is significantly associated with the early recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 17, 6040–6051.

White, J.D., Hewett, P.W., Kosuge, D., McCulloch, T., Enholm, B.C., Carmichael, J., and Murray, J.C. (2002). Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 62, 1669–1675.

Wijkström, H., Norming, U., Lagerkvist, M., Nilsson, B., Näslund, I., and Wiklund, P. (1998). Evaluation of clinical staging before cystectomy in transitional cell bladder carcinoma: A long-term follow-up of 276 consecutive patients. *Br J Urol* *81*, 686–691.

Wirtz, R.M., Fritz, V., Stöhr, R., and Hartmann, A. (2016). Molekulare Klassifikation des Harnblasenkarzinoms: Mögliche Ähnlichkeit zum Mammakarzinom. *Pathologe* *37*, 52–60.

Wu, P., Liu, S., Zhang, W., Zhang, Y., Zhu, G., Wei, D., Wan, B., and Wang, J. (2015). Low-level Ki-67 expression as an independent predictor of bladder tumour recurrence in patients with primary upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. *45*, 1175–1181.

Yang, H., Kim, C., Kim, M.-J., Schwendener, R. a, Alitalo, K., Heston, W., Kim, I., Kim, W.-J., and Koh, G.Y. (2011). Soluble vascular endothelial growth factor receptor-3 suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in bladder cancer. *Mol Cancer* *10*, 36.

Yeh, C.M., Sung, W.W., Lai, H.W., Hsieh, M.J., Yen, H.H., Su, T.C., Chang, W.H., Chen, C.Y., Ko, J.L., and Chen, C.J. (2016). Opposing prognostic roles of nuclear and cytoplasmic RACGAP1 expression in colorectal cancer patients. *Hum Pathol* *47*, 45–51.

Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P.M., Hayes, M.M., and Gelmon, K.A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* *11*, 174–183.

Zhao, W., and Fang, G. (2005). MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13158–13163.

Zhou, M., He, L., Zu, X., Zhang, H., Zeng, H., and Qi, L. (2011). Lymphatic vessel density as a predictor of lymph node metastasis and its relationship with prognosis in urothelial carcinoma of the bladder. *BJU Int* *107*, 1930–1935.

Zhou, Y., Shan, S., Li, Z.-B., Xin, L.-J., Pan, D.-S., Yang, Q.-J., Liu, Y.-P., Yue, X.-P., Liu, X.-R., Gao, J.-Z., et al. (2017). CS2164, a novel multi-target inhibitor against tumor angiogenesis, mitosis and chronic inflammation with anti-tumor potency. *Cancer Sci* 108, 469–477.

Zu, X., Tang, Z., Li, Y., Gao, N., Ding, J., and Qi, L. (2006). Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis. *BJU Int* 98, 1090–1093.

Eigene Veröffentlichungen:

Originalarbeit:

Martini, T., Heinkele, J., Mayr, R., Weis, C.-A., Wezel, F., Wahby, S., Eckstein, M., Schnöller, T., Breyer, J., Wirtz, R., Ritter, M., Bolenz, C., Erben, P. (2018). Predictive value of lymphangiogenesis and proliferation markers on mRNA level in urothelial carcinoma of the bladder after radical cystectomy. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 36, 530.e19-530.e27.

Posterpräsentation:

33. Deutscher Krebskongress:

Heinkele, J., Martini, T., Wezel, F., Steidler, A., Weis, C.-A., Eckstein, M., Hartmann, A., Bolenz, C., Erben, P. (2018). mRNA Lymphangiogenesis and Proliferation Markers in Association with Survival in Urothelial Carcinoma after Radical Cystectomy.

7 ANHANG

7.1 Materialliste

Geräte und Materialien

Bezeichnung/Name	Hersteller	Bestellnummer
Cool Cut HM 355S Ser. Nr. 23206	Microm GmbH Walldorf, Deutschland	905450
Flex Cycler ² Base Unit	Biometra GmbH Göttingen, Deutschland	844-00069
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA	I-302
Minispin Zentrifuge	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	5452
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems Carlsbad, USA	4360954
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems Carlsbad, USA	4376592
HTA-Biotec Thermomixer	HTA-Biotec Bovenden, Deutschland	C-100035
Tischzentrifuge Rotina 420 R	A. Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland	4706
MS1 Minishaker	IKA Works. Inc. Wilmington, USA	Z404047
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0,1ml)	Applied Biosystems Carlsbad, USA	4346907

Reagenzien

Name	Hersteller	Bestellnummer
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen Carlsbad, USA	28025-013
Neo-Clear	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland	1.09843.5000
Nuclease freies Wasser	Promega Fitchburg, USA	P1193
p(dN) ₆ Random Primer	Roche AG Basel, Schweiz	11034731001

RNAseOUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen Carlsbad, USA	10777-019
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen Carlsbad, USA	18080-044
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems Carlsbad, USA	4444557
XTRAKT FFPE Kit (96)	Stratifyer Köln, Deutschland	# XTK2.0-96
100 mM dNTP Set	Invitrogen Carlsbad, USA	10297-018

7.2 Primer, Sonden und Genprodukte

Primer und zugehörige Sonden wurden alle über die Eurofins MWG Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Alle Primer überbrücken ein Intron.

Primer

Gen	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
Calm	GAGCGAGCTGAGTGGTTGTG	AGTCAGTTGGTCAGCCATGCT
RPL37A	TGTGGTTCCTGCATGAAGACA	GTGACAGCGGAAGTGGTATTGTAC
MKI67	TGCTACTCCAAAG	GTATGAGCTTTCCCTATTATTATGGTAC
RACGAP1	GAATGTGCGGAATCTGTTTGAG	TCGCCAACTGGATAAATTGGA
VEGFR-3	CGAAAGTGCATCCACAGAGAC	GTCGRGGTCTTTGTAGATGTCC
VEGF-C	CCGATGCATGTCTAACTGGATG	CAGGTCTTGTTGCTGCCTG
VEGF-D	CAGGTTGTAAGTGCTTGCCAACA	ATGGGAACAGCGATCTTCTTCAG

Sonden

Gen	Sequenz (5'→3')	5'-Reporter	3'-Quencher
Calm	TCGCGTCTCGGAAACCGGTAGC	FAM	BHQ2
RPL37A	TGGCTGGCGGTGCCTGGA	FAM	BHQ2
MKI67	CGAAGTTCACAGTCAATTTAGTACAGGCCAC	FAM	TAM
RACGAP1	ACTGAGAATCTCCACCCGGCGCA	FAM	BHQ2
VEGFR-3	ACATTCTGCTGTGCGAAAGCGACGTGGTG	FAM	BHQ1
VEGF-C	CAGACAAGTTCATTCCATTATTAGACGTTCCCTG	FAM	BHQ1
VEGF-D	CCCGCCATCCATACTCAATTATCAGAAGATCCA	FAM	BHQ1

Genprodukte

Genbezeichnung	Genprodukt
Calm	GAGCGAGCTGAGTGGTTGTGTGGTTCGCGTCTCGGAAACCGG-TAGCGCTTGCAGCATGGCTGACCAACTGACT

RPL37A	TGTGGTTCCTGCATGAAGACAGTGGCTGGCGGTGCCTGGACGTACAA- TACCACTTCCGCTGTCAC
MKI67	TGCTACTCCAAAGAAGCCTGTGGGCGAAGTTCACAGTCAATTTAG- TACAGGCCACGCAAACTCTCCTTGTACCATAATAATAGGGAAAGCTCATAC
RACGAP1	GAATGTGCGGAATCTGTTTGAGCAGCTTGTGCGCCGGGTGGAGATTCT- CAGTGAAGGAAATGAAGTCCAATTTATCCAGTTGGCGA
VEGFR-3	CGAAAGTGCATCCACAGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTCTGCTGTCG- GAAAGCGAC- GTGGTGAAGATCTGTGACTTTGGCCTTGCCCGGGACATCTACAAAGACCC CGAC
VEGF-C	CCGATGCATGTCTAAACTGGATGTTTACAGA- CAAGTTCATTCCATTATTAGAC- GTTCCCTGCCAGCAAACTACCACAGTGTGAGGCAGCGAACAAGACCTG
VEGF-D	CAGGTTGTAAGTGCTT- GCCAACAGCCCCCGCCATCCATACTCAATTATCAGAA- GATCCATCCAGATCCCTGAAGAAGATCGCTGTTCCCAT

7.3 Fragebogen für niedergelassene Hausärzte und Urologen



Medizinische Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
Universitätsklinikum Mannheim



**Urologische Universitätsklinik
Mannheim**
Direktor: Prof. Dr. med. M. S. Michel
Tel.: +49 621 383-1259
Fax: +49 621 383-1452

BITTE ANTWORT AN FAXNUMMER 0621-383 1452

PATIENTENDATEN

Name _____ Geburtsdatum: _____
Operation: Radikale Zystektomie am _____

Kommentar:

Letzter Besuch in meiner Praxis: ____/____/____

1. Wurde eine ADJUVANTE CHEMOTHERAPIE durchgeführt?

ja nein nicht bekannt

wenn ja → Welche Chemotherapie? _____

Wie viele Zyklen? _____

2. LOKALREZIDIV NACH Zystektomie

ja nein nicht bekannt

wenn ja → Zeitpunkt des Lokalrezidivs: ____/____/____

Lokalisation (Becken? Oberer Harntrakt? Seite?): _____

Sekundäre Therapie (z.B. Radiatio): _____

3. METASTASEN IM VERLAUF NACH Zystektomie

ja nein nicht bekannt

wenn ja → Lokalisation: _____

Zeitpunkt der Diagnose: ____/____/____

4. VERSTORBEN AN DEM UROTHELKRZINOM?

ja nein (Todesursache: _____) nicht bekannt

wenn ja → Todesdatum: ____/____/____ nicht bekannt

Aufsichtsratsvorsitzender:
Oberbürgermeister Dr. Peter Kurz
Geschäftsführer
Dr. Jörg Blattmann
Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. Frederik Wenz

Bankverbindungen
Sparkasse Rhein Neckar Nord
Kto. 30 251 113 BLZ 670 505 05
Postbank Karlsruhe
Kto. 17 820 755 BLZ 660 100 75

Registergericht
Mannheim HRB-Nr. 7331
Sitz und Gerichtsstand Mannheim
Institutskennzeichen 2608 20569

Lieferadresse
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim
Internetadresse
www.klinikum-mannheim.de



8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Heinkele, Jakob
Geburtsdatum: 06.09.1991
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Familienstand: ledig
Vater: Dr. med. dent. Martin Heinkele
Mutter: Christine Heinkele

SCHULISCHER WERDEGANG

2003 – 2011 Kolleg St. Sebastian Stegen (Gymnasium)
27.05.2011 Abitur (Note 1,1)

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2011/2012 Beginn des Studiums der Medizin
Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
02.09.2013 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
2013-2018 Hauptstudium
29.06.2018 Beginn der Promotionsarbeit
Urologisches Forschungslabor der Urologischen Klinik, Me-
dizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
12.10.2018 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
28.11.2018 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

9 DANKSAGUNGEN

Priv. Doz. Dr. med. Philipp Erben danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten, sowie für die enge und engagierte Betreuung während der Laborarbeit und darüber hinaus. Besonderen Dank schenke ich Herrn Dr. med. Thomas Martini von der Urologischen Universitätsklinik Ulm für die Betreuung und die gemeinsame Arbeit an Poster, Vortrag und Publikation. Mein Dank geht außerdem an das ganze Team des urologischen Forschungslabors insbesondere an Katja Nitschke, Sarah Wahby und ganz besonders an Annette Steidler. Dr. med. Cleo Weis aus dem pathologischen Institut danke ich herzlich für die Einarbeitung bei der Beurteilung und beim gemeinsamen Durchsehen der Tumorpräparate. Frau Büttner aus der Abteilung für medizinische Statistik danke ich für die statistische Beratung.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner Schwester Johanna für die unermüdliche Unterstützung während des ganzen Studiums und der Promotionsarbeit durch alle Höhen und Tiefen hinweg.