

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Peter Wild

**Molekulare Subklassifizierung des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der
Harnblase mittels Proteinexpression von CK5/6, CK20, GATA3, p53 und
Synaptophysin**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Alina Schwarz

aus Würzburg

Frankfurt am Main, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Peter Wild

**Molekulare Subklassifizierung des muskelinvasiven Urothelkarzinoms
der Harnblase mittels Proteinexpression von CK5/6, CK20, GATA3, p53
und Synaptophysin**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Alina Schwarz

aus Würzburg

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Peter Wild
Koreferent:	Prof. Dr. Frederik Roos
Tag der mündlichen Prüfung:	07.05.2024

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis.....	5
2	Abbildungsverzeichnis.....	7
3	Tabellenverzeichnis.....	8
4	Einleitung.....	9
4.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	9
4.2	Pathologie, Staging und Grading.....	10
4.3	Symptomatik, Diagnostik und Therapie	11
4.4	Prognose.....	13
4.5	Histologische Subtypenbestimmung.....	14
4.6	Molekulare Marker	17
4.7	Ziele der Arbeit.....	19
5	Patienten, Material und Methoden	21
5.1	Datenerhebung und Patientenkollektiv.....	21
5.2	Übersicht des Arbeitsprozesses	22
5.3	Material und Methoden.....	23
5.3.1	Sammlung und Auswertung von vorhandenem Gewebematerial.....	23
5.3.2	Anfertigung und Färbung neuer Schnitte.....	23
5.3.3	Herstellung des Tissue-Microarrays	25
5.4	Tabellen zur übersichtlichen Darstellung aller verwendeten Materialien.....	29
5.4.1	Geräte und Software	29
5.4.2	Puffer und Lösungen	30
5.4.3	Antikörper	30
5.5	Lichtmikroskopische Beurteilung der Färbeergebnisse	31
5.5.1	Lichtmikroskopische Auswertung der H/E-Färbung.....	31
5.5.2	Lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	31
5.6	Statistische Auswertung der Färbeergebnisse	32
6	Ergebnisse	36
6.1	Auswertung der Gesamtkohorte.....	36
6.1.1	Allgemeine Beschreibung der Kohorte: Verteilung von Alter, Geschlecht, Tumorstadium	36
6.1.2	Histologische Subtypenverteilung.....	38
6.1.3	IHC-Klassifizierung	40
6.2	Subgruppenanalyse: Zystektomie Überlebensanalyse	57

6.2.1	Allgemeine Beschreibung der Kohorte der Subgruppe.....	57
6.2.2	Kaplan-Meier-Kurven der Subgruppenanalyse	60
6.2.3	Uni- und multivariate Überlebensanalysen	65
7	Diskussion.....	69
7.1	Ziel der Untersuchung.....	69
7.2	Repräsentativität der Studienkohorte	69
7.3	Bewertung der Untersuchung.....	71
7.4	Abschließender Ausblick	76
8	Zusammenfassung Deutsch	78
9	Zusammenfassung Englisch.....	80
10	Literaturverzeichnis.....	82
11	Danksagung	99
12	Schriftliche Erklärung	100

1 Abkürzungsverzeichnis

NMIBC	Non-muscle-invasive Bladder Cancer
MIBC	Muscle-invasive Bladder Cancer
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	Weltgesundheitsorganisation
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
NAC	neoadjuvante Chemotherapie
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitoren
PD-1	Pembrolizumab, Nivolumab
PD-L1	Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab
CTLA-4	Ipilimumab, Tremelimumab
OS	Overall Survival = Gesamtüberleben
DFS	Disease Free Survival = krankheitsfreies Überleben
AUA	American Urological Association
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ASTRO	American Society for Radiation Oncology
SUO	Society of Urologic Oncology
EAU	European Association of Urology
TCGA	The Cancer Genome Atlas
FGFR3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FOXA1	Forkhead box Protein A1
TMA	Tissue-Microarray
H/E	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
CK5/6	Cytokeratin 5/6
CK20	Cytokeratin 20
GATA3	Glutaryl-Aminotransferase-Untereinheit A bindendes Protein 3
p53	Tumorsuppressor 53
SYNAPT	Synaptophysin

TP53	Tumorsuppressorprotein 53
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
HR	Hazard Ratio

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht des Arbeitsprozesses	22
Abbildung 2 Darstellung der digitalisierten H/E-Schnitte im „CaseViewer“	25
Abbildung 3 Darstellung der Slide-Overlay-Funktion.....	26
Abbildung 4 Darstellung der finalen TMA-Herstellung	27
Abbildung 5 allgemeine Beschreibung der Studienkohorte: Alter, Geschlecht, Tumorstadium	37
Abbildung 6 histologische Subtypenbestimmung anhand der ursprünglichen H/E-Schnitte: Beispiele ¹²²	38
Abbildung 7 lichtmikroskopische Auswertung der CK5/6, CK20, GATA3 und SYNAPT IHC	40
Abbildung 8 lichtmikroskopische Auswertung der IHC: Verteilungsmuster von p53	41
Abbildung 9 Histogramm der p53 Immunhistochemie.....	41
Abbildung 10 deskriptive Statistik: Verteilungsmuster von CK5/6, CK20, GATA3, SYNAPT.....	43
Abbildung 11 Darstellung der deskriptiven Statistik der CK5/6-IHC.....	46
Abbildung 12 Darstellung der deskriptiven Statistik der GATA3-IHC.....	50
Abbildung 13 lichtmikroskopische Auswertung: Kombination der CK5/6 und GATA3-IHC.....	54
Abbildung 14 deskriptive Statistik: Kombination der Ergebnisse von CK5/6 und GATA3	56
Abbildung 15 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach Tumorstadium	61
Abbildung 16 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach Lymphknotenstatus	62
Abbildung 17 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach adjuvanter Chemotherapie....	63
Abbildung 18 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach IHC-Status.	64
Abbildung 19 Multivariates Cox-Regressionsmodell für das OS.....	67
Abbildung 20 Multivariates Cox-Regressionsmodell für das DFS	68

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ein- und Ausschlusskriterien zur Erstellung der Studienkohorte	23
Tabelle 2 H/E-Färbeprotokoll des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie Frankfurt.....	24
Tabelle 3 immunhistochemisches Färbeprotokoll	28
Tabelle 4 Übersicht aller verwendeten Geräte	29
Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Softwarepakete	29
Tabelle 6 Übersicht aller verwendeten Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 7 Übersicht aller verwendeten Antikörper.....	30
Tabelle 8 Codierung des Verteilungsmusters.....	32
Tabelle 9 Übersicht über die zur statistischen Auswertung verwendeten Variablen.....	33
Tabelle 10 Verteilung der histologischen Subtypen innerhalb der Studienkohorte.....	39
Tabelle 11 Lichtmikroskopische Auswertung der gültigen und ausgeschlossenen Fälle für die IHC	42
Tabelle 12 lichtmikroskopische Auswertung: Darstellung des Verteilungsmusters der IHC	43
Tabelle 13 deskriptive Statistik der CK5/6-IHC.....	45
Tabelle 14 deskriptive Statistik der CK20-IHC	48
Tabelle 15 deskriptive Statistik der GATA3-IHC	50
Tabelle 16 deskriptive Statistik der p53-IHC	52
Tabelle 17 deskriptive Statistik der Synaptophysin-IHC.....	53
Tabelle 18 Zusammenfassung der Ergebnisse der Gesamtkohorte.....	55
Tabelle 19 Zusammenfassung der Ergebnisse der Subgruppenanalyse	59
Tabelle 20 univariates Cox-Regressionsmodell für histologischen Subtyp und IHC-Status.....	66

4 Einleitung

4.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom stellte 2020 die siebthäufigste Krebserkrankung weltweit dar.¹ In Deutschland treten jedes Jahr etwa 30.000 Neuerkrankungen auf.⁴ Dabei sind zu einem Viertel Frauen und zu drei Vierteln Männer betroffen.

Es gibt bekannte sowie potenzielle Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom. Neben dem Tabakrauchen gehört die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen zu den Wichtigsten.⁵ Tabakrauch stellt den Hauptrisikofaktor eines Harnblasenkarzinoms dar. 50–65 % der Karzinomfälle bei Männern und 20–30 % der Fälle bei Frauen sind darauf zurückzuführen.⁶ Das Risiko steigt mit der Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten sowie der Dauer des Rauchens.⁷ Es sinkt dagegen nach Beendigung des Rauchens und ist nach 15 Jahren Rauchfreiheit ungefähr gleich mit dem eines Nichtraucher.⁸

Die berufliche Exposition wurde erstmals 1895 von Rehn im Zusammenhang mit Beschäftigten in der Anilinfarbstoffindustrie beobachtet.⁹ Spätere Untersuchungen bei Farbstoffarbeitern ergaben, dass die aromatischen Amine Benzidin, 2-Naphthylamin und möglicherweise 1-Naphthylamin als Blasenkarzinogene gelten.¹⁰ Es wird geschätzt, dass der Kontakt mit berufsbedingten Karzinogenen bis zu 25 % aller Blasentumoren verursacht.¹¹ Neben aromatischen Aminen zählen auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Chlorkohlenwasserstoff zu den gefährdenden beruflich bedingten Expositionen.^{12,13}

Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms ist eine chronische, durch *Schistosoma haematobium* verursachte Infektion des Harntraktes.¹⁴ Die daraufhin entstehenden Blasentumoren sind normalerweise squamöse Tumoren. Aber auch chronische Entzündungen des Urothels sowie Harnsteine werden als potentieller Risikofaktor eines Harnblasenkarzinoms angesehen.^{15,16}

Eine erbliche Komponente wird in den Zusammenhang mit der Entstehung eines Harnblasenkarzinoms gebracht. Dabei konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Verwandte ersten und zweiten Grades ein erhöhtes Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, aufweisen.¹⁷

4.2 Pathologie, Staging und Grading

Auf pathologischer Ebene finden sich in Europa in über 90% der Harnblasenkarzinome reine Urothelkarzinome.¹⁸ Daneben kommen auch glanduläre, papilläre oder plattenepitheliale Differenzierungen vor.¹⁹ Es werden nicht-muskelinvasive Urothelkarzinome (Non-muscle-invasive Bladder Cancer, NMIBC) von muskelinvasiven Urothelkarzinomen (Muscle-invasive Bladder Cancer, MIBC) unterschieden, wobei die Verteilung bei Erstdiagnose bei 3:1 liegt.²⁰ Nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2004/2016 erfolgt ein Staging und Grading für Urothelkarzinome folgendermaßen²¹:

Für das Staging wird die sogenannte TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) verwendet. Dabei steht der Buchstabe T für die Ausbreitung des Tumors, N für den Lymphknotenbefall und M für die Metastasierung.^{2,22} Tis steht für nicht invasive, flache Tumoren mit geringer Differenzierung und Ta für papilläre, nicht invasive Tumoren. Diese beiden T-Kategorien zählen zu den nicht invasiven Harnblasenkarzinomen. Ab einem Stadium T1 spricht man von invasiven Tumoren. T1 zeigt dabei eine Invasion in die Lamina submucosa.²³ T2 bedeutet eine Infiltration in die Muskulatur der Harnblase, T3 in das perivesikale Gewebe und T4 über die Harnblase hinaus in Nachbarorgane. Die N-Kategorie wird unterteilt in N0 bis N3.²³ Bei N0 sind keine Lymphknoten befallen. N1 bezeichnet Tumoren mit solitären und N2 mit multiplen Lymphknotenmetastasen. Bei einem N3-Stadium finden sich Metastasen in den Lymphknoten entlang der Arteriae iliacae communes. Im Unterschied dazu beschreibt die M-Kategorie Fernmetastasen.²³ Bei einem M0-Stadium sind keine, bei einem M1-Stadium sind Fernmetastasen vorhanden. Um zwischen pathologischen und klinischen Befunden unterscheiden zu können, wird vor den jeweiligen Buchstaben der Kategorie bei klinischen Befunden ein c und bei pathologischen Befunden ein p gesetzt.²³ Man spricht daher beispielsweise von einem cT- oder einem pT-Stadium.

Für das "Grading" der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erfolgt eine Klassifizierung in Papillom, papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP), high grade und low grade Urothelkarzinome.^{14,20} Diese Einteilung stellt für NMIBCs mit den wichtigsten prognostischen Aussagefaktoren dar. MIBCs sind dagegen

immer high grade Karzinome und es können deshalb keine prognostischen Aussagen aufgrund der Einstufung des Gradings gemacht werden.²⁴ Für die Einschätzung der Prognose der Patienten mit MIBC kann stattdessen die Einteilung in morphologische und ggf. in Zukunft in molekulare Subtypen hilfreich sein.^{25- 29}

4.3 Symptomatik, Diagnostik und Therapie

Je nach Lage und Ausdehnung des Tumors zeigen Blasenkarzinome unterschiedliche Symptome. Die meisten Patienten mit urothelialen Tumoren weisen zumindest eine mikroskopische Hämaturie auf.³⁰ Am häufigsten ist eine schmerzlose Hämaturie. Diese tritt bei bis zu 85% der Patienten auf.³¹ Eine schmerzhafte Miktion ist möglich. Bei großen Tumoren kann die Blasenkapazität eingeschränkt sein, was zu häufigem Wasserlassen führt. Tumoren, die sich am Blasen Hals befinden oder einen großen Bereich der Blase bedecken, können eine Dysurie sowie vermehrte Dringlichkeit und Häufigkeit des Harndrangs verursachen. Tumoren, die die Harnleiteröffnung infiltrieren, können zu einer Hydronephrose und damit zu einer schlechten Prognose führen.³² Seltener treten im fortgeschrittenen Stadium tastbare Beckenmassen oder Ödeme der unteren Extremitäten auf. Bei Symptomen wie Gewichtsverlust, Bauch- oder Knochenschmerzen können sich bereits Metastasen gebildet haben.¹⁴

Weist ein Patient für ein Harnblasenkarzinom typische Symptome auf, wird eine ausgiebige Untersuchung eingeleitet. Dazu zählen die körperliche Untersuchung des Patienten, eine Bildgebung des oberen Harntraktes sowie die Entnahme von Zellen für eine zytologische Untersuchung.³³ Die Auswertung der zytologischen Proben kann durch eine geringe Zellausbeute, Harnwegsinfektionen und -steine oder intravesikale Instillationen erschwert werden. Je nach Erfahrung des Untersuchers kann die Spezifität jedoch bei über 90 % liegen.^{34,35} Die Sensitivität ist für high-grade Urothelkarzinome hoch und für low-grade Karzinome niedrig.³⁶ Eine negative Zytologie schließt dabei einen Tumor nicht aus. Die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms wird grundsätzlich durch eine Zystoskopie und die histologische Beurteilung des entnommenen Gewebes gestellt.² Im Falle einer positiven Bildgebung kann eine diagnostische Zystoskopie entfallen und direkt eine transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) durchgeführt werden. Dabei wird Gewebe aus der Blasenwand bis in die Schicht des M. detrusor

vesicae entnommen.³⁷ Bei nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen hat die TUR-B therapeutischen Charakter und dient der kompletten Resektion des Tumors. Ist ein Harnblasenkarzinom bereits bis in die Muskelschicht vorgedrungen, kann mit Hilfe der TUR-B mindestens ein pT2 Stadium diagnostiziert und im Anschluss eine entsprechende Therapie eingeleitet werden.² In vielen Fällen ist eine zweite TUR-B in einem Abstand von zwei bis sechs Wochen indiziert.²²

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms unterscheidet sich je nach Eindringtiefe des Tumors. Während sich bei nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen an die TUR-B eine intravesikale Chemo- oder Immuntherapie anschließt, stellt die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie in der Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms den heutigen Standard dar.^{2,22} Da diese jedoch nur ein 5-Jahres-Überleben bei ca. 50% der Patienten ermöglicht, werden zusätzlich neoadjuvante und adjuvante Chemotherapien angewendet. Seit den 1980er Jahren wird bei Patienten mit Tumoren ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen eine neoadjuvante Chemotherapie (NAC) auf Cisplatinbasis eingesetzt.² Eine derartige präoperative Chemotherapie kann bei Patienten, die auf diese ansprechen, einen großen positiven Einfluss auf das Überleben haben.^{38,39} Für Patienten, welche nicht auf die NAC ansprechen, stellt die Behandlung dagegen eine unnötige Belastung dar.⁴⁰ Adjuvante Chemotherapien werden nach radikaler Zystektomie bei organüberschreitenden MIBCs und/oder Tumoren mit Lymphknotenmetastasen angewendet.⁴¹ Dazu sind weder eine bevorzugte Kombination von Chemotherapeutika noch eine bestimmte Anzahl an Zyklen bekannt. Jedoch ist entscheidend, dass das Zytostatikum Cisplatin verwendet wird.² Ob ein Patient für eine Chemotherapie mit Cisplatin geeignet ist, wird anhand des Tumorstadiums sowie des allgemeinen Zustands des Patienten entschieden. Es findet bislang kein Einsatz prädiktiver Marker statt, sodass Patienten, welche auf solch eine Therapie von Grund auf nicht ansprechen würden, nicht herausgefiltert werden und damit unnötig belastet werden.² Es gibt bislang keine Studien, die neoadjuvante und adjuvante Chemotherapien direkt miteinander vergleichen. Die bekannten Studien wurden mehrfach in Metaanalysen untersucht.^{42,43} Vorteile einer neoadjuvanten Therapie sind der bessere Allgemeinzustand der Patienten vor Zystektomie und die höhere Anzahl durchgeführter Studien. Das genauere Staging durch die

histopathologische Untersuchung des Zystektomie-Präparats spricht für eine adjuvante Therapie. Weitere Therapieansätze des MIBCs sind die Radiochemotherapie und die Immuntherapie.²

Die Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Harnblasenkarzinoms hat hingegen rein palliativen Charakter. Patienten, die in diesem Stadium nicht therapiert werden, überleben durchschnittlich nur 3 bis 6 Monate.⁴⁴ Tumoren, die nicht zu resezieren oder lokal fortgeschritten sind, können unterschiedliche Symptome verursachen, welche den Allgemeinzustand sowie die Lebensqualität erheblich einschränken.² Dazu zählen Schmerzen, Dysurie, Blutungen und Harnwegsobstruktion. In solchen Fällen kann eine palliative Zystektomie durchgeführt werden.⁴¹ Jedoch geht diese mit deutlich erhöhten Komplikationsraten einher.⁴⁵

Nach jahrelang fehlenden Neuerungen in der Therapie des fortgeschrittenen und metastasierten Harnblasenkarzinom sind seit 2016 Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) in der Therapie des MIBCs zugelassen.⁴⁶ Immun-Checkpoint-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper.⁴⁷ Sie sind gegen PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab), PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab) oder CTLA-4 (Ipilimumab, Tremelimumab) gerichtet. ICIs können als Erstlinientherapie für Patienten, die für eine Cisplatinbehandlung nicht in Frage kommen, oder als Zweitlinientherapie für Patienten mit metastasiertem MIBC verwendet werden.⁴⁸ Jedoch sprechen nur circa 20-30% der Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom auf eine ICI-Therapie an. Um für Patienten die optimale ICI-Behandlung bestimmen zu können, wäre die Etablierung eines oder mehrerer klinisch nützlicher Biomarker neben der etablierten Expression von PD-L1 sinnvoll.⁴⁸

4.4 Prognose

Obwohl das MIBC nur circa 25% der Patienten mit Blasenkrebs ausmacht,^{49,50} ist es mit einem signifikanten Sterberisiko behaftet, welches sich seit Jahrzehnten kaum verändert hat.^{48,51,52} Die radikale Zystektomie geht mit hohen Raten perioperativer Komplikationen innerhalb der ersten zwei Jahre nach Operation einher.⁵³⁻⁵⁵ Die Rezidivrate nach der Operation ist hoch und die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate (OS) liegt für pT3-Tumoren bei 43 % und bei 25 %, wenn der Tumor in lokale Lymphknoten

gestreut hat.^{56,57} Das mediane Überleben von Patienten mit metastasiertem MIBC, die mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie behandelt werden, liegt zwischen neun und 26 Monaten.³³ Die neueste Leitlinie der „American Urological Association“ (AUA), der „American Society of Clinical Oncology“ (ASCO), der „American Society for Radiation Oncology“ (ASTRO) und der „Society of Urologic Oncology“ (SUO) bietet einen risikostratifizierten Rahmen für die Behandlung von MIBC.⁵⁸ Laut dieser Leitlinie sind übergeordnete pathologische Prädiktoren für Rezidive und Überleben von Patienten mit MIBC das Tumorstadium und der Lymphknotenbefall. Das Geschlecht, das Vorhandensein einer Hydronephrose, eine lymphatische Invasion, der Status des Weichteilrands und molekulare Subtypisierungsmerkmale sind weitere Faktoren, die die Prognose beeinflussen.⁵⁸ Je nach vorliegender histologischer Variante kann sich die Behandlung dieser Tumorarten von der des konventionellen MIBCs unterscheiden.

4.5 Histologische Subtypenbestimmung

Um entsprechend dieser Subtypen behandeln zu können, muss zunächst eine Identifikation von histologischen Varianten stattfinden. Diese kann eine Herausforderung darstellen, da es eine hohe Variabilität zwischen den beobachtenden Pathologen sowie eine große Heterogenität innerhalb der Harnblasenkarzinome gibt.⁵⁹ Laut Leitlinie sollte deshalb bei Verdacht einer histologischen Variante ein erfahrener Uropathologe hinzugezogen und idealerweise der Prozentsatz des entsprechenden Subtyps beschrieben werden. Durch eine pathologische Nachuntersuchung von Zystektomiepräparaten durch erfahrene Uropathologen können bei bis zu 33% der Patienten histologische Varianten erkannt werden und zu diesen Varianten passende Therapien eingeleitet werden.^{60,61} Verglichen mit Karzinomen reinen urothelialen Ursprungs können Tumoren mit histologischen Varianten lokal weiter fortgeschritten sein und Therapieentscheidungen dadurch beeinflussen.⁶²⁻⁶⁴

In der WHO-Klassifikation von 2016 werden Sonderformen und seltene Varianten des MIBCs berücksichtigt.²¹ Die invasiven Karzinome werden in Urothelkarzinome mit 12 Varianten sowie die Sonderformen Plattenepithel-, Adeno- und kleinzellige Karzinome gegliedert. Das Urothelkarzinom neigt dabei häufig zu unterschiedlicher Differenzierung.¹⁴ Die verschiedenen Subtypen können in reiner Form, in Kombination

mit dem konventionellen Urothelkarzinom oder in Kombination mit anderen Varianten auftreten.⁶⁵

Zu den häufigsten Subtypen zählen die plattenepitheliale oder drüsige Differenzierung, die sarkomatoide Differenzierung und die reinen Plattenepithelkarzinome.^{14,65}

Plattenepitheliale Differenzierungen finden sich in bis zu 40% aller Urothelkarzinome. In diesen Fällen liegt eine Entdifferenzierung des Urothels vor, welche morphologisch und immunhistochemisch gut vom konventionellen Urothelkarzinom abgegrenzt werden kann.⁶⁶

Die drüsige Differenzierung tritt in bis zu 16% der Fälle auf und wird durch das Vorhandensein von glandulären Bereichen, welche teilweise Schleim sezernieren, charakterisiert.⁶⁷

Alle weiteren Differenzierungen treten selten auf.⁶⁵ Die sarkomatoiden Urothelkarzinome (<1%) zeigen gleichzeitig sowohl epitheliale als auch mesenchymale Differenzierungen.³ Dabei besteht der epitheliale Anteil aus urothelialen, glandulären oder kleinzelligen Komponenten und der mesenchymale Anteil aus einer undifferenzierten, hochgradig spindelzelligen Neoplasie. Diese Karzinome entstehen häufig in Folge von Strahlentherapie oder Chemotherapie.³ Die Diagnostik ist für den Pathologen nicht einfach, da eine Ähnlichkeit zu zahlreichen gutartigen bis hochmalignen Veränderungen besteht. Sarkomatoide Karzinome gehen mit einer schlechten Prognose einher.⁶⁸

Die nestartigen (nested) Urothelkarzinome (<1%) imponieren durch ein nestförmiges Wachstumsmuster mit Invasion in die Muscularis propria sowie Zellanplasie in den tieferen Bereichen der Läsion.⁶⁵ Diese Tumoren sind aggressiv und häufig bereits lokal fortgeschritten.^{3,69} Außerdem sprechen sie nur bedingt auf Chemotherapie an.⁷⁰

Eine besonders aggressive Variante stellt das Urothelkarzinom mit mikropapillärer Differenzierung dar.³ Es wird häufig spät diagnostiziert und ist bereits früh lymphogen metastasiert.⁷¹ Das mikropapilläre Urothelkarzinom tritt in 0,5-6% aller Urothelkarzinome auf und ist durch infiltrierende, traubenförmige Tumorzellverbände umgeben von fadenförmigen Spalträumen gekennzeichnet.³ Diese Tumoren zeigen ein 5-Jahresüberleben von nur 51% sowie ein 10-Jahresüberleben von nur 24%.⁷² Bezüglich der Therapie empfiehlt sich eine frühe radikale Zystektomie auch bei nicht-muskelinvasiven Tumoren.⁷³

Eine weitere aggressive Variante mit stark verkürzten Überlebensraten ist die plasmazytoide Differenzierung (<1%).⁷⁴ Sie ist durch mittelgroße Zellen mit eosinophilem Zytoplasma gekennzeichnet.³ Zahlreiche Mitosen und ein diffuses infiltratives Wachstumsmuster mit einer minimalen Stromareaktion sind typisch. Sie ähneln daher einem Plasmazytom oder Lymphom.⁶⁵ Es besteht ein hohes Risiko für lokale Rezidive mit peritonealer Karzinomatose.^{75,76}

Das reine Plattenepithelkarzinom tritt in 3-5% aller Harnblasentumoren auf.¹⁴ Es ist histologisch durch prominente Interzellularbrücken, Zytoplasmaeosinophilie, abortive Einzelzellverhornung und Hornperlen gekennzeichnet.^{14,77} Immunhistochemisch lässt es sich durch eine vollständige, starke Anfärbbarkeit mit den Zytokeratinen 5/6 oder 5/14 diagnostizieren, während Urothel- oder Mischkarzinome nur eine basale bzw. partielle Anfärbung mit diesen Zytokeratinen aufweisen.^{65,78}

Eine weitere Variante stellt das Adenokarzinom der Harnblase dar.⁶⁵ Es ist durch rein glanduläre Neoplasien mit einem echten Lumen in tubulären oder enterischen Drüsen, die Schleim produzieren, gekennzeichnet.¹⁴ Die histologischen Wachstumsmuster reichen vom intestinalen Typ, über den muzinösen, den Sieglerringzell-Typ, den klarzelligem, den hepatoiden, den gemischten bis zum nicht weiter spezifizierten Typ (NOS).^{14,79}

In 2% der Fälle kommt eine sogenannte partielle oder komplette neuroendokrine Differenzierung vor.⁸⁰ Histologisch sind die neuroendokrinen Karzinome der Harnblase durch kleine, blaue, runde Zellen, d.h. an einem „neuroendokrinen Bild“ zu erkennen.⁶⁵ Unabhängig von der Größe des neuroendokrinen Anteils sollten diese Karzinome als kleinzellige Karzinome der Harnblase bezeichnet werden. Kleinzellige Tumoren nehmen in den meisten Fällen einen aggressiven Verlauf und sind bei Diagnose bereits häufig metastasiert.¹⁴ Folglich sind in diesen Fällen radikale Therapieansätze mit neoadjuvanter Chemotherapie von Nöten.

Um richtige prognostische sowie therapeutische Schlüsse je nach vorliegendem histologischen Subtyp ziehen zu können, gilt es, ein großes Augenmerk auf die Identifikation histologischer Subtypen in der Diagnostik zu legen.

4.6 Molekulare Marker

In den letzten Jahren haben verschiedene unabhängige Gruppen die Existenz unterschiedlicher molekularer Subtypen in MIBC nachgewiesen.^{26,27,81,82} Dazu wurden RNA-Sequenzierungen zur Bestimmung von mRNA-Expressionsprofilen verwendet.^{26,27,82} Die zwei primären Subtypen des MIBC sind der luminaire und der basale Subtyp, welche den bekannten Brustkrebs-Subtypen ähneln.^{82,83} In verschiedenen Studien wurden diese Subtypen weiter untergliedert.

Laut Krebsgenom-Atlas (The Cancer Genome Atlas, TCGA) lassen sich zwei molekulare Haupttypen – der luminaire und der basal-squamöse Subtyp – des MIBC unterscheiden.²⁸ Die luminalen Typen lassen sich wiederum untergliedern in den luminal-papillären, den luminal-infiltrierten und den luminalen Subtyp. Zusätzlich gibt es den neuronalen Subtyp, welcher mit einem schlechten Überleben einhergeht. Somit wurden fünf verschiedene Subtypen bestimmt. Je nach Subtyp gibt es unterschiedliche Mutationsprofile, histopathologische Merkmale sowie prognostische und therapeutische Auswirkungen.⁸³ Der basal-squamöse Subtyp ist durch die Expression basaler Keratinmarker und Immuninfiltrate gekennzeichnet und gilt als chemotherapiesensitiv. Im Gegensatz dazu sind die luminalen Subtypen durch Veränderungen des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 3 (FGFR3) (luminal-papillär) und Marker für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (luminal-infiltriert) gekennzeichnet und werden mit Chemotherapieresistenz in Verbindung gebracht.^{26-28,84}

In der Konsensusklassifikation von Kamoun et al. werden sechs molekulare Klassen von MIBC unterschieden: luminal papillär (Luminal papillary, LumP), luminal unspezifiziert (Luminal nonspecified, LumNS), luminal instabil (Luminal unstable, LumU), stromareich (Stroma-rich), basal/squamös (Basal/squamous, Ba/Sq) und neuroendokrin-ähnlich (Neuroendocrine-like, NE-like).²⁹ Diese unterscheiden sich in onkogenen Mechanismen, der Infiltration durch Immun- und Stromazellen sowie histologischen und klinischen Merkmalen. Die Konsensusklassifikation bringt alle zuvor veröffentlichten Klassifizierungsschemata miteinander in Einklang. Die Autoren betonen allerdings, dass ein Konsens über die biologischen und nicht über die klinischen Klassen erzielt wurde, sodass weitere Studien nötig sind, welche die Etablierung der molekularen Subtypen in den klinischen Alltag bearbeiten.

Luminale Subtypen sind durch die Expression bestimmter Zytokeratine (CK20), eine starke Expression von Östrogenrezeptor-assoziierten Transkriptionsfaktoren (GATA3, FOXA1) sowie der Rezeptortyrosinkinase HER2 gekennzeichnet.^{85,86} Basale Subtypen gehen häufig mit plattenepithelialen Differenzierungen einher. Solche Tumoren exprimieren basale bzw. plattenepitheliale Zytokeratine (CK5/6, CK14), Regulationsproteine bestimmter onkogener Signalwege (RB1, MYC, E2F3) und regulieren Zelloberflächenproteine (CD44) hoch.^{85,86}

Um zwischen luminalen und basalen Subtypen im klinischen Alltag ohne großen Aufwand unterscheiden zu können, könnten immunhistochemische Färbungen zu Hilfe genommen werden. In einigen Studien wurde die Detektion der molekularen Subtypen mithilfe bestimmter immunhistochemischer Färbungen bereits beschrieben. So wurde eine Korrelation zwischen mRNA-Expressionsprofilen und IHC-Färbeargebnissen in luminalen (CK20-Expression) und basalen (CK5/6-Expression) Subtypen berichtet und auch bestätigt.⁸⁴ In einer Metaanalyse wurde gezeigt, dass die GATA3- und die CK5/6-Expression durch IHC diese beiden Subtypen mit einer Genauigkeit von mehr als 90% identifizieren kann.⁸⁷ Eine weitere Studie stellte fest, dass der basal-squamöse Subtyp ebenso wie eine verminderte GATA3-Expression mit einem schlechten klinischen Verlauf korrelieren.^{88,89}

Klinisch wurde auch gezeigt, dass die molekularen Subtypen mit unterschiedlichen Ergebnissen und Reaktionen auf eine Chemotherapie einhergehen.^{84,90} Auf Biomarkern basierende Auswahlkriterien für Chemotherapien sind bisher nicht in den aktuellen Leitlinien enthalten.² Sie wären aber in Zukunft sinnvoll, um herauszufinden, welche Patienten potenziell auf eine Chemotherapie ansprechen. Dadurch könnte den MIBC Patienten, die aufgrund ihres vorliegenden Subtyps nicht ansprechen würden, die Toxizität einer systemischen Therapie erspart bleiben.

Die bisherigen Ergebnisse haben alle großes Potenzial, die Therapie von MIBC zu verbessern. Es gibt jedoch immer noch viele Unsicherheiten. Die meisten Gruppen definierten die Subtypen, indem sie die Expression von Hunderten von Genen gemessen haben; diese Methoden lassen sich aufgrund der hohen Kosten und des hohen Aufwands nicht in die tägliche klinische Praxis übertragen.^{25-26,81,84} Es gilt also, relevante Ersatzmarker zu etablieren, um die molekulare Subtypisierung so einfach und machbar umzusetzen, wie es bei Patientinnen mit Brustkrebs bereits der Fall ist.⁹¹

4.7 Ziele der Arbeit

Um diesem Ziel der molekularen Subtypisierung von MIBC Patienten ein Stück näher zu kommen, wurden in der vorliegenden Arbeit 181 Fälle mit MIBC in Form zweier Tissue-Microarrays (TMAs) untersucht. Die TMAs wurden mehrfach geschnitten. Anschließend wurden eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E-Färbung) sowie immunhistochemische Färbungen (IHC-Färbungen) durchgeführt. Für die IHC-Färbungen wurden Antikörper gegen Cytokeratin 5/6 (CK5/6), Cytokeratin 20 (CK20), Glutaryl Aminotransferase-Untereinheit A bindendes Protein 3 (GATA3), Tumorsuppressor p53 (p53) und Synaptophysin (SYNAPT) verwendet.

Cytokeratine sind Intermediärfilamentproteine, die für Epithelzellen charakteristisch sind.⁹² Das Übergangsepithel des Harntrakts zeigt Veränderungen in der Expression und Konfiguration der Cytokeratin-Isotypen, die mit der Art und Beschaffenheit einer urothelialen Neoplasie zusammenhängen.⁹³ Dadurch entstehen je nach vorliegendem Tumor und verwendeter Immunhistochemie unterschiedliche Färbemuster. Die CK5/6-Färbung diente der Detektion basaler Subtypen.⁸⁴ Die CK20-Färbung wurde angewendet, um luminale Subtypen zu identifizieren.

Der Transkriptionsfaktor GATA3 nimmt Einfluss auf die Differenzierung und Funktion verschiedener Zelltypen und Gewebe.⁹⁴ Ist GATA3 mutiert, kommt es zu Veränderungen der DNA-Bindungsaktivität und Proteinstabilität. Mutationen des GATA3-Gens sind auch beim Mammakarzinom bekannt.⁹⁵ GATA3 Proteinexpression gilt als Marker für die Differenzierung von luminalen Zellen in Brust und Blase.⁹⁶ Ein GATA3-Verlust ist beim Harnblasenkarzinom mit einem invasiven, weniger differenzierten Phänotyp verbunden und ist in 5-13% der Harnblasenkarzinome mutiert.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Es wurde berichtet, dass die Empfindlichkeit für GATA3 in Neoplasmen hoch ist und diesen Marker wertvoller macht als andere verfügbare immunhistochemische Marker.¹⁰¹ GATA3 fungiert im Panel zur Bestätigung vieler epithelialer oder mesenchymaler Neoplasmen und dient sowohl als diagnostisches als auch als prognostisches Werkzeug.

Das Tumorsuppressorgen *TP53* (TP53) ist für die Induktion von Zellzyklusstillstand, Apoptose und DNA-Reparatur zuständig.^{102,103} Tumorprotein-53-Genmutationen gehören zu den häufigsten Mutationen menschlicher Malignome.¹⁰⁴ 40% der

Blasentumoren und sogar 70% der MIBC zeigen eine Mutation im Gen *TP53*.^{105,106} Solche Mutationen können dazu führen, dass die Karzinogenese durch Steigerung der Zellproliferation, Verlust der Apoptose und insuffiziente DNA-Reparatur beschleunigt wird.¹⁰⁷ Eine Überexpression des p53 Proteins tritt bei Patienten mit Harnblasenkarzinom häufig auf und ist mit höheren Raten von Progression und Rezidiven assoziiert.¹⁰⁸ Neben einem Einfluss auf die Prognose wird auch ein Einfluss auf die Chemosensitivität solcher Tumoren diskutiert.¹⁰⁹ Immunhistochemische Färbungen mit p53 sind bereits lange etabliert und p53 ist heute einer der am weitesten untersuchten molekularen Marker des MIBC.¹¹⁰

Synaptophysin ist ein Membranprotein, das in der Membran synaptischer Vesikel vieler Nervenzellen vorkommt. Da viele neuroendokrine Tumoren Synaptophysin exprimieren, kann es zum histopathologischen Nachweis neuroendokriner Tumoren benutzt werden.¹¹¹ Verschiedene Studien haben bereits von einem kleinen molekularen Subtyp berichtet, der basale und lumbale Marker sowie neuroendokrine Marker exprimiert.^{28,112} Zu dieser neuroendokrinen Expression zählt unter anderem Synaptophysin. Dieser molekulare Subtyp zeigt häufig eine Korrelation mit histologisch neuroendokrinen Tumoren.¹¹³

Anhand der H/E-Schnitte der TMAs wurde für jeden der 181 Fälle der histologische Subtyp durch zwei unabhängige Uropathologen des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie Frankfurt am Main bestimmt. Mit Hilfe der IHC-Färbungen wurde jedem der 181 MIBC-Fälle ein entsprechender molekularer Subtyp zugeordnet. In einem zweiten Schritt wurde eine Überlebensanalyse für 110 MIBC-Patienten durchgeführt, die mit einer radikalen Zystektomie therapiert wurden.

Ziele dieser Doktorarbeit waren (i) die Untersuchung der Expression von luminalen und basalen Proteinmarkern, (ii) die Untersuchung der Assoziation daraus abgeleiteter molekularer Subtypen des MIBC mit klinisch-pathologischen Charakteristika und (iii) die Analyse des Einflusses der molekularen Subtypen auf das Überleben der MIBC Patienten mit und ohne adjuvante Chemotherapie.

5 Patienten, Material und Methoden

In den folgenden Kapiteln wird der Arbeitsprozess der Datenerhebung, der Herstellung des Tissue-Microarrays und der Datenauswertung beschrieben.

5.1 Datenerhebung und Patientenkollektiv

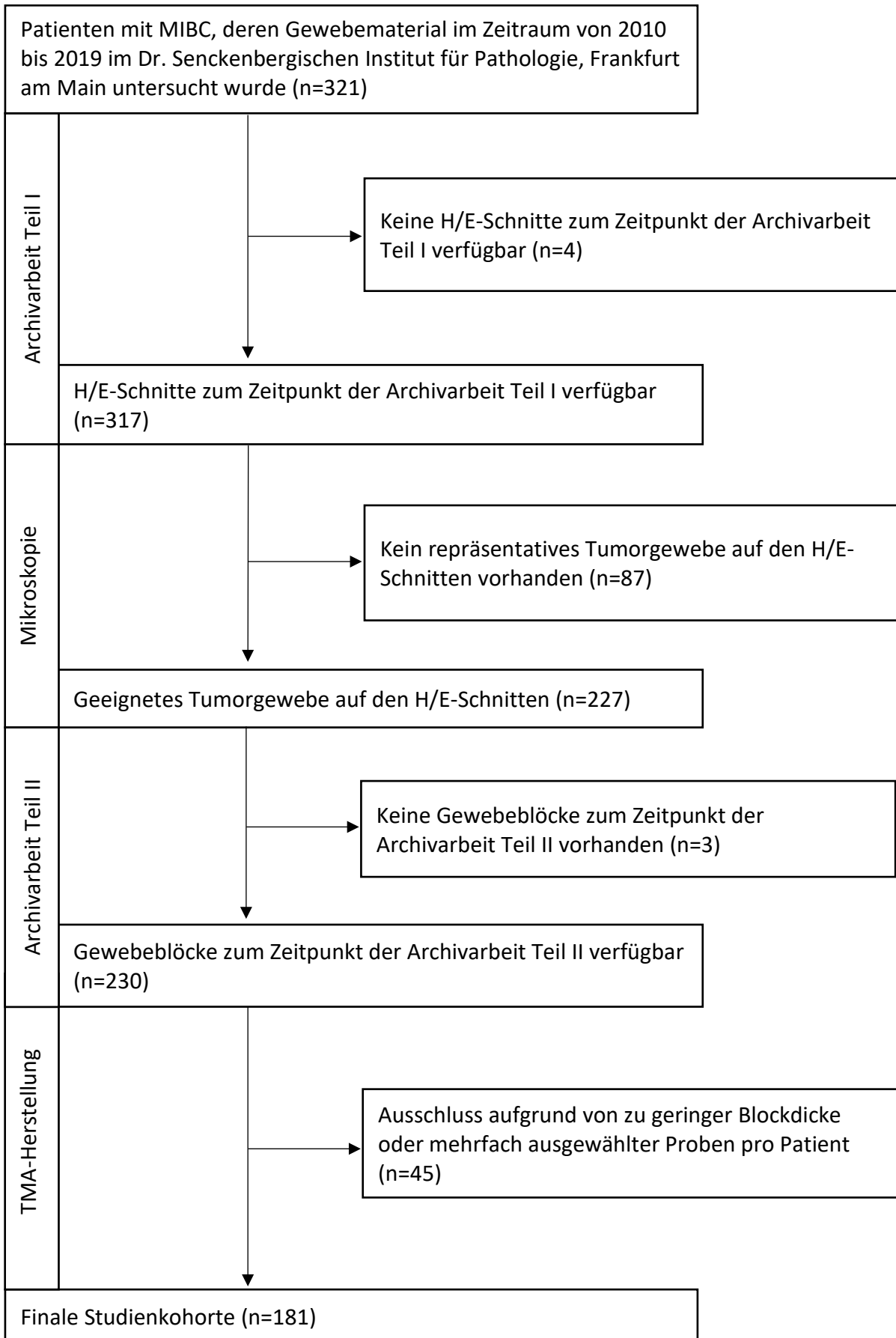
Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive unizentrische Biomarkerstudie über das muskelinvasive Urothelkarzinom der Harnblase. Es wurden Gewebeproben und klinische Daten von Patienten mit MIBC der Stadien pT2 bis pT4 analysiert, die in den Jahren 2010 bis einschließlich 2019 mit einer transurethralen Resektion oder einer Zystektomie der Harnblase in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main behandelt wurden.

Die Datenerhebung begann im Mai 2020 und endete im April 2021. Das Ethikvotum (Projektnummer SUG-6-2018; UCT-53-20), das gemäß den lokalen und nationalen Vorschriften und gemäß der Erklärung von Helsinki durchgeführt wurde, lag bereits am vierten Dezember 2019 vor.

Um eine repräsentative Patientenkohorte zu erstellen, wurde das Befundsystem dc-Pathos (dc-Systeme Informatik GmbH, Heiligenhausen; Deutschland) des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie Frankfurt am Main nach Gewebeproben mit der Diagnose „muskelinvasives Urothelkarzinom der Harnblase“ aus den Jahren 2010 bis einschließlich 2019 durchsucht. Ein Ausschluss erfolgte aufgrund von zu geringer Gewebegröße oder wenn kein primäres Urothelkarzinom der Harnblase vorlag.

Der Datensatz wurde um klinische Daten aus dem Krankenhausinformationssystem Orbis (DH Healthcare GmbH, Bonn; Deutschland) ergänzt. Insgesamt fanden sich 181 Patienten mit MIBC, die für die Erstellung des TMA verwendet werden konnten. Nachfolgend ist der Arbeitsprozess im Detail dargestellt.

5.2 Übersicht des Arbeitsprozesses



5.3 Material und Methoden

5.3.1 Sammlung und Auswertung von vorhandenem Gewebematerial

Alle Objektträger der ausgewählten Fälle wurden unter dem Mikroskop auf vorhandenes, für den TMA brauchbares Tumormaterial untersucht. Hierbei war entscheidend, dass ausreichend Tumorgewebe von mindestens 1,0 mm Durchmesser vorhanden war. Außerdem wurden Schnitte mit größeren Anteilen von Nekrose, Stroma oder Verkalkungen ausgeschlossen. Ebenso wurden die Schnittpräparate hinsichtlich der histologisch-pathologischen Diagnose kontrolliert. Dies erfolgte durch die zu dieser Zeit am Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie Frankfurt am Main angestellte Uropathologin Vanessa Henriques.

Tabelle 1 Ein- und Ausschlusskriterien zur Erstellung der Studienkohorte

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Primärtumor mit Lokalisation in der Harnblase	kein primäres Urothelkarzinom der Harnblase
pT-Stadium ≥ 2	pT-Stadium < 2
Durchmesser Tumorgewebe $\geq 1,0$ mm	Durchmesser Tumorgewebe $< 1,0$ mm
keine Nekrose	ausgedehnte Nekrose
wenig Stroma	reichlich Stroma
keine Verkalkungen	Verkalkungen

5.3.2 Anfertigung und Färbung neuer Schnitte

Um das Gewebematerial der ausgewählten Proben zu überprüfen, wurden die entsprechenden Paraffinblöcke neu angeschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zur Herstellung neuer Gewebeschnitte wurde das Schlittenmikrotom Slide 4003 E (pfm AG, Köln; Deutschland) benutzt. Bei der Verwendung von Schlittenmikrotomen wird der Gewebblock zunächst auf der vorgesehenen Halterung fixiert und die gewünschte Schnittdicke (in der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mikrometer verwendet) auf einer Skala eingestellt.¹¹⁴ Ein Messerschlitten wurde anschließend auf einer horizontalen Gleitbahn so bewegt, dass eine dünne Schicht von der Oberfläche des Gewebeblocks abgetragen wurde. Diese wurde in ein Wasserbad gegeben und vorsichtig auf einen

frischen Objektträger aufgezogen. Abschließend folgte eine Trocknung, sodass der neue Schnitt auf dem Objektträger fixierte.

Die H/E-Färbung wurde mit Hilfe des Färbeautomaten ST5020 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar; Deutschland) voll automatisiert und nach aktuell gültiger Arbeitsanweisung des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie Frankfurt am Main durchgeführt (siehe Tab. 2).

Um eine Färbung von Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE) durchführen zu können, war zunächst eine Entparaffinierung und Rehydrierung des Gewebes erforderlich.¹¹⁴ Da Paraffin hydrophobe und alkoholunlösliche Eigenschaften besitzt, würde es das Eindringen eines Farbstoffes in wässriger oder alkoholischer Lösung erschweren.

Tabelle 2 H/E-Färbeprotokoll des Dr. Senckenbergischen Instituts für Pathologie Frankfurt

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit in Minuten
Entparaffinierung		
1	Xylol	02:30
2	Xylol	02:30
3	100% Ethanol	02:00
4	96% Ethanol	01:00
5	70% Ethanol	01:00
6	fließend wässern	01:20
Färbung		
7	Mayer's Hematoxylin	08:00
8	fließend wässern	07:00
9	2% Eosin-Lösung	01:00
10	fließend wässern	spülen
11	70% Ethanol	00:20
12	96% Ethanol	01:00
13	100% Ethanol	01:30
14	Xylol	01:00
15	Xylol	01:30
16	-	eindecken

5.3.3 Herstellung des Tissue-Microarrays

Zur Herstellung des Tissue-Microarrays wurden der Scanner „PANORAMIC SCAN II“ (3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn) und der „TMA Grand Master“ (3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn) verwendet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die neu angefertigten Gewebeschnitte wurden mit dem "PANORAMIC SCAN II" unter Verwendung der Panoramic Scan Software (3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn) eingescannt. Es wurde eine 20-fache Vergrößerung verwendet. Durch das Programm „CaseViewer 2.4“ (3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn) konnten die digitalisierten Schnitte aufgerufen und die für den TMA verwendbaren Spenderblöcke ausgewählt werden. Auf den digitalisierten Gewebeschnitten wurden Tumorareale annotiert, die für den TMA in Frage kamen. Dabei wurden Bereiche mit einem Durchmesser von 1,0 mm ausgewählt.

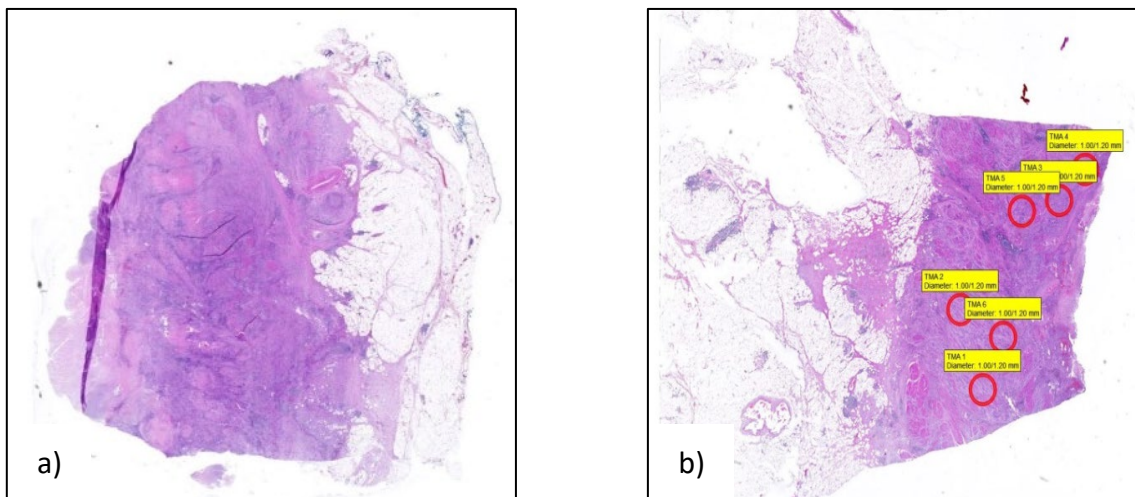


Abbildung 2 Darstellung der digitalisierten H/E-Schnitte im „CaseViewer“

Abbildung 2a) zeigt die Ansicht eines digitalisierten H/E-Schnitts im Programm CaseViewer 2.4 (3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn). Auf Abbildung 2b) sind die im Programm CaseViewer vorgenommenen Annotationen (Größe 1,0 mm) der für die Erstellung des TMAs geeigneten Tumorareale zu erkennen.

Mit dem „TMA Grand Master“ wurden die Oberflächen der Spenderblöcke gescannt und konnten im Programm „TMA Control“ (3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn) angesehen werden. Hier konnten durch eine Slide-Overlay-Funktion die zuvor getätigten TMA-Markierungen auf die passenden Spenderblöcke übertragen werden. Nach Auswahl eines entsprechenden Layouts für den Spenderblock sowie der geeigneten Tumor-Annotationen wurden diese automatisch ausgestanzt und direkt in den Empfängerblock eingebracht. Neben den Gewebeproben von Patienten mit MIBC wurden auch Gewebestanden zur Orientierung verwendet.

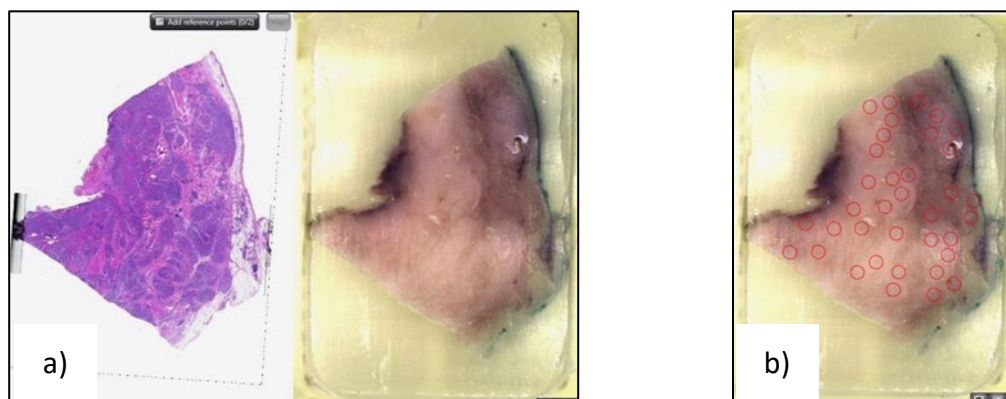


Abbildung 3 Darstellung der Slide-Overlay-Funktion

In Abbildung 3 ist die Ansicht im Programm „TMA Control“ (3DHistech Ltd., Budapest, Ungarn) dargestellt. Abbildung 3a) zeigt auf der linken Seite einen digitalisierten H/E-Schnitt und auf der rechten Seite den entsprechenden mit dem „TMA Grand Master“ (3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn) eingescannten Spenderblock. Durch eine sogenannte Slide-Overlay-Funktion konnten die Annotationen der HE-Schnitte auf den Spenderblock übertragen werden (Abb. 3b).

Im Anschluss wurden die hergestellten TMA-Blöcke kurzzeitig auf 60 Grad Celsius erhitzt, sodass die verwendeten Stanzen und das Paraffin vollständig verschmelzen konnten.

In einen TMA-Block können infolge des Designs des TMAs maximal 100 Stanzen mit einem Millimeter Durchmesser eingebracht werden. Aufgrund der Größe der Kohorte wurde diese auf zwei TMA-Blöcke aufgeteilt. Zusätzlich wurde jeder TMA-Block in dreifacher Ausführung angefertigt, um eine Reserve für zukünftige Projekte zu haben. Insgesamt sind daher sechs TMA-Blöcke mit MIBC entstanden.

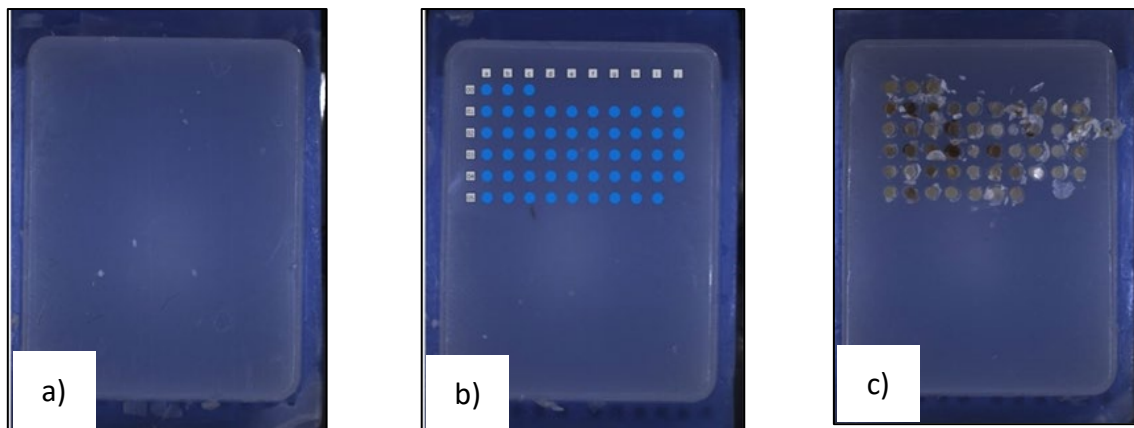


Abbildung 4 Darstellung der finalen TMA-Herstellung

Abbildung 4 zeigt die finale Herstellung des TMAs. Für den leeren Empfängerblock (Abb. 4a) wurde ein passendes Layout ausgewählt (Abbildung 4b)), nach welchem anschließend die Stanzen aus den Spenderblöcken in den Empfängerblock eingebracht wurden (Abb. c)).

Die TMA-Blöcke wurden wie oben beschrieben mit dem Mikrotom angeschnitten und die Schnitte auf Objektträger aufgetragen. Einerseits erfolgte eine klassische H/E-Färbung und andererseits immunhistochemische Färbungen. Diese werden im folgenden Kapitel beschrieben.

5.3.3.1 Durchführung der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine leistungsstarke mikroskopische Technik zur Visualisierung von zellulären Komponenten.¹¹⁵ Sie wurde in den 1940er Jahren erfunden und wird routinemäßig für diagnostische Zwecke oder zur Stratifizierung von optimierten Behandlungsregimen in der Pathologie eingesetzt.¹¹⁶ Aber auch in der Forschung ist die IHC-Technik weit verbreitet, um Proteine von Interesse zu analysieren und dadurch ihre Rolle sowohl in gesunden als auch in kranken Zellen und Geweben zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die IHC genutzt, um zwischen den bekannten molekularen Subtypen des MIBC's unterscheiden zu können.

5.3.3.2 Schritte einer Immunhistochemie-Färbung

Eine immunhistochemische Färbung beruht auf dem Nachweis von kleinen Bereichen auf der Oberfläche von Antigenen, so genannten Epitopen im Gewebe, die von einem einzelnen Zielprotein in einer Gewebeprobe exprimiert werden.¹¹⁵ Es wird ein Primärantikörper hinzugegeben, der diese Epitope mit hoher Spezifität bindet. Nach dem Epitop-Antikörper-Bindungsereignis folgt ein Sekundärantikörper, welcher wiederum an den primären Antikörper mit hoher Spezifität bindet. Der Sekundärantikörper ist an ein Reportermolekül gekoppelt. Auf das Antikörper-Antikörper-Bindungsereignis folgt die Zugabe eines chemischen Substrats, das mit dem Reportermolekül reagiert. Dadurch wird an der Stelle des gesamten Epitop-Antikörper-Komplexes ein farbiges Produkt erzeugt.¹¹⁶

Für die vorliegende Arbeit wurde die IHC mit dem Dako Omnis System (Agilent, Santa Clara; United States) vollautomatisiert durchgeführt. Alle verwendeten Biomarker waren im Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie Frankfurt am Main bereits etabliert. Nachdem die Gewebeschnitte durch das DC-Modul (Biocare Medical, Pacheco; United States) entparaffiniert und die Antigene demaskiert wurden, konnte ein Primärantikörper hinzugegeben werden. Es folgte die Detektion des Antikörpers mit Hilfe des Dako Flex Kits (Agilent, Santa Clara; United States). Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt und die Objektträger wurden automatisch auf Wasserbasis eingebettet. Dies wurde für die Proteine Cytokeratin 5/6 (CK5/6), Cytokeratin 20 (CK20), p53 und Synaptophysin (SYNAPT) durchgeführt (siehe Tab. 3).

Tabelle 3 immunhistochemisches Färbeprotokoll

Zielprotein/ Protokoll	Antikörper	Vor- behandlung	pH	Inkubation (min.)	Ver- dünnung	Bearbeitung
CK5/6	Anti-Human Cytokeratin 5/6	97°C	6	30	Ready-to- Use	Omnis FLEX
CK20	Anti-Human Cytokeratin 20	97°C	6	30	Ready-to- Use	Omnis FLEX
P53	Anti-Human p53 Protein	97°C	9	20	Ready-to- Use	Omnis FLEX
SYNAPT	Anti-Human Synaptophysin	97°C	9	20	Ready-to- Use	Omnis FLEX
GATA3	Anti-Human GATA3	97°C	9	20	Ready-to- Use	Omnis FLEX

5.4 Tabellen zur übersichtlichen Darstellung aller verwendeten Materialien

5.4.1 Geräte und Software

Tabelle 4 Übersicht aller verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Mikrotom Slide 4003 E	pfm AG, Köln; Deutschland
Färbeautomat Leica ST5020	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar; Deutschland
Eindeckautomat Tissue-Tek Film	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn; Niederlande
Decloaking chamber	Biocare Medical, Pacheco; United States
Dako Omnis	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
Pannoramic SCAN II	3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn
TMA Grandmaster	3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Softwarepakete

Software	Hersteller	Version
dc-pathos	dc-Systeme Informatik GmbH, Heiligenhaus; Deutschland	
Orbis	DH Healthcare GmbH, Bonn; Deutschland	
CaseViewer	3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn	2.3
Pannoramic Control	3DHISTECH Ltd., Budapest; Ungarn	3.0.1
TMA Control	3DHSITECH Ltd., Budapest; Ungarn	3.1.5.118158
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond; USA	16.0
SPSS Statistics	IBM, Ehningen; Deutschland	28.0.1
R Statistical Software	R-Tools Technology Inc., Richmond Hill; Kanada	4.1
R Studio	R-Tools Technology Inc., Richmond Hill; Kanada	2021.09.1+372

5.4.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 6 Übersicht aller verwendeten Puffer und Lösungen

Reagenz	Referenz- nummer	Hersteller
Wash Buffer (20x)	GC80711	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
Envision™ Flex Trs High Ph (50x)	GV80411	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
Envision™ Flex Trs Low Ph (50x)	GV80511	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
Envision™ Flex+ Mouse (Linker)	GV82111	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
Envision™ Flex+ Rabbit (Linker)	GV80911	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System	GV82511	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
Hämatoxylin	GC80811	Dako/Agilent, Santa Clara, CA, United States
2% Eosin-Lösung -100g Eosin (Firma Waldeck Best. 1B-425) - 5000ml Aqua Dest.	-	Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie Frankfurt am Main

5.4.3 Antikörper

Tabelle 7 Übersicht aller verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Referenz- nummer	Host
Anti-Human Cytokeratin 5/6	D5/16 B4	Dako	GA780	mMouse
Anti-Human Cytokeratin 20	Ks20.8	Dako	GA777	mMouse
Anti-Human p53 Protein	DO-7	Dako	GA616	mMouse
Anti-Human Synaptophysin	DAK-SYNAP	Dako	GA660	mMouse
GATA3	L50-823	Cell Marque	390M-18	mMouse

5.5 Lichtmikroskopische Beurteilung der Färbeergebnisse

Zur Beurteilung der Färbeergebnisse wurden alle TMA-Schnitte zunächst mit dem „Pannoramic Slide Scanner“ (3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn) digitalisiert. Die Auswertung erfolgte durch zwei Betrachter. Eine erste Analyse wurde von der Verfasserin dieser Arbeit vorgenommen. Im Anschluss wurden die Ergebnisse durch Prof. Dr. med. Peter Wild überprüft und ggf. korrigiert. Die Einteilung der Färbeergebnisse wird im Folgenden erklärt.

5.5.1 Lichtmikroskopische Auswertung der H/E-Färbung

In einem ersten Schritt wurden die konventionellen H/E-Färbungen lichtmikroskopisch auf Eignung zur Auswertung überprüft. In einem weiteren Schritt wurden die Färbungen zusätzlich durch einen dritten Betrachter analysiert. Der Urothologe Prof. Dr. med. Henning Reis bestimmte lichtmikroskopisch für jeden Spot den vorliegenden histologischen Subtyp. Die Histopathologie wurde somit von zwei erfahrenen Urogenitalpathologen systematisch nach aktuellen WHO-Kriterien überprüft.²¹ Histologische Subtypen wurden berichtet, wenn mindestens 10% des Tumors eine Subtyp-Histologie zeigten, einschließlich reiner und gemischter Tumoren.

5.5.2 Lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemisch mit CK5/6, CK20, GATA3 und Synaptophysin gefärbten TMA-Schnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Für jeden Spot bzw. Patienten wurde dabei das immunhistochemische Färbeergebnis einzeln beurteilt. Dabei wurde das Verteilungsmuster (Prozent der angefärbten Tumorzellen) auf einer semiquantitativen Skala von 0+ bis 3+ beurteilt. Dieses Schema stellt Tabelle 8 dar. Für die p53-Färbung wurde das Verteilungsmuster für jeden Spot bzw. Patienten in Prozent der positiven Tumorzellen angegeben (nukleäre Immunreaktivität).

Tabelle 8 Codierung des Verteilungsmusters

Semiquantitative Beurteilung des Verteilungsmusters		
0+	keine Zellen angefärbt	0 %
1+	wenig Zellen angefärbt	1-10%
2+	einige Zellen angefärbt	10-50%
3+	viele Zellen angefärbt	>50%

Tabelle 8 zeigt die Codierung des Verteilungsmusters, welches als Prozent der angefärbten Zellen angegeben wird. Die Scala beginnt bei 0+ (nicht angefärbt) und endet bei 3+ (stark gefärbt).

5.6 Statistische Auswertung der Färbeergebnisse

Die statistische Auswertung wurde von Herrn Prof. Dr. med. Peter Wild und Herrn Dr. med. Florestan Koll vorgenommen und erfolgte computergestützt durch das Programm „IBM SPSS Statistics for Windows“, Version 24 (IBM Corp., Armonk, New York, USA). Die folgende Tabelle (Tabelle 9) gibt eine Übersicht über die Charakteristika der zur statistischen Auswertung verwendeten Variablen inklusive Beschreibung und Skalenniveau.

Tabelle 9 Übersicht über die zur statistischen Auswertung verwendeten Variablen

Variable	Beschreibung	Skalenniveau
Alter_OP	Alter zum Zeitpunkt der Operation (Jahre)	metrisch
Geschlecht	1: männlich 2: weiblich	nominal
max. pathologisches Tumorstadium	Maximales pathologisches Tumorstadium des Patienten (TURB oder radikale Zystektomie): 1: pT2 2: pT3 3: pT4	ordinal
max. pathologisches Lymphknotenstadium	Maximales pathologisches Lymphknotenstadium des Patienten während der gesamten Behandlungs- und Nachbeobachtungszeit: 1: pN0 2: pN1 3: pNx	ordinal
Subtyp_TMA	lichtmikroskopisch beurteilter Subtyp einer Patientenprobe anhand der TMA-Schnitte: 0: NOS 1: squamös 2: mikropapillär 3: neuroendokrin 4: andere	nominal
Subtyp_Slide	lichtmikroskopisch beurteilter Subtyp einer Patientenprobe anhand aller verfügbaren HE-Schnitte: 0: NOS 1: squamös 2: mikropapillär 3: neuroendokrin 4: andere	nominal
Subtyp_kombiniert	lichtmikroskopisch beurteilter Subtyp als Kombination der Ergebnisse aus TMA und Slide: 0: NOS 1: squamös 2: mikropapillär 3: neuroendokrin 4: andere	nominal

OP: Operation, pT: pathologisches Tumorstadium, pN: pathologisches

Lymphknotenstadium, pNx: nicht angegeben, NOS: nicht weiter spezifiziert.

Zunächst wurde eine deskriptive statistische Analyse des Patienten- und Probenkollektivs inklusive Beschreibung der Häufigkeiten und Häufigkeitsverteilungen der einzelnen in Tabelle 9 aufgeführten Variablen durchgeführt, um erste Aussagen über die Zusammensetzung der Studienpopulation und die Ausprägungen der einzelnen Variablen machen zu können. Ein statistischer Zusammenhang (Assoziation) zwischen klinisch-pathologischen, immunhistochemischen und molekularen Variablen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson überprüft und die Ergebnisse wurden in Form von Kreuztabellen dargestellt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ verwendet. Ein p-Wert von kleiner 0,05 wurde somit als signifikant und ein p-Wert kleiner 0,01 als hochsignifikant gewertet.

Im Anschluss daran wurde eine Subgruppenanalyse von 110 Patientenproben durchgeführt. Diese Patienten hatten in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Frankfurt eine radikale Zystektomie mit kurativer Absicht erhalten und wurden anschließend nachbeobachtet. Patienten mit metastasierter Erkrankung oder neoadjuvanter Chemotherapie wurden von den Analysen ausgeschlossen, um ein homogenes Patientenkollektiv zu erhalten. Zunächst wurde auch für die Subgruppe eine deskriptive Analyse mit Beschreibung der Häufigkeiten und Häufigkeitsverteilungen der individuellen Variablen durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Überlebensanalyse. Das Gesamtüberleben (OS), das als Zeitintervall zwischen Operation und Tod definiert wurde, wurde als Hauptendpunkt von Interesse bestimmt. Sekundärer Endpunkt war das krankheitsfreie Überleben (DFS). Hierfür wurde das Zeitintervall zwischen Operation und Tod oder Rezidiv gewertet.¹¹⁷

Um Überlebenswahrscheinlichkeiten abzuschätzen und zu veranschaulichen, wurden Kaplan-Meier-Schätzer angewendet. Diese Methode diente der Messung des Anteils der Patienten, die für eine bestimmte Zeit nach der Behandlung lebten.¹¹⁸ Die Zeit von einem definierten Punkt bis zum Auftreten eines bestimmten Ereignisses wird dabei als Überlebenszeit und die Analyse von Gruppendaten als Überlebensanalyse bezeichnet.^{119,120} Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, in einer bestimmten Zeit zu überleben, während die Zeit in vielen kleinen Intervallen berücksichtigt wird. Die Überlebenskurve kann unter der Annahme verschiedener Situationen erstellt werden. Sie beinhaltet die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten des Auftretens eines Ereignisses zu einem bestimmten Zeitpunkt

und die Multiplikation dieser aufeinanderfolgenden Wahrscheinlichkeiten mit früheren berechneten Wahrscheinlichkeiten, um eine endgültige Schätzung zu erhalten.¹¹⁸ Um zwei oder mehr Kurven miteinander vergleichen zu können, wurde der Log-Rank Test verwendet. Dadurch konnte festgestellt werden, ob ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen bestand.¹¹⁷

Um herauszufinden, wie einzelne oder mehrere Faktoren die Krankheitsentwicklung beeinflussen, wurden in einem letzten Schritt der Auswertung uni- und multivariate Analysen durchgeführt. Eine univariate Analyse untersucht dabei eine einzige abhängige Variable, während eine multivariate Analyse zwei oder mehr abhängige Variablen gleichzeitig betrachtet. Für diese Analysen wurden die proportionalen Hazards-Modelle von Cox verwendet, um die Hazard Ratio (HR) und das entsprechende 95%-Konfidenzintervall für Kovariaten für OS und DFS zu schätzen.¹²¹ Alle Tests waren zweiseitig und es wurde auch hier ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit der R Statistical Software (Version 4.1) und R Studio (Version 2021.09.1+372) vorgenommen.

6 Ergebnisse

Zur übersichtlichen Darstellung der Ergebnisse wird im Folgenden zunächst eine deskriptive Auswertung der Häufigkeiten und Häufigkeitsverteilungen vorgenommen und die Assoziation der klinisch-pathologischen Variablen mit den Ergebnissen der Immunhistochemie untersucht. In einem zweiten Teil folgt die bereits genannte Subgruppenanalyse inklusive uni- und multivariater Analysen sowie einer Überlebensanalyse nach Kaplan und Meier.

6.1 Auswertung der Gesamtkohorte

In einem ersten Schritt der Auswertung wurden die H/E- und die immunhistochemisch gefärbten Schnitte lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei wurden einige Spots bewusst aus der Bewertung ausgeschlossen. Von den 186 Proben auf dem TMA wiesen 184 Spots ein MIBC auf und zwei Spots wurden aufgrund fehlenden muskelinvasiven Tumorgewebes nicht in die Auswertung miteinbezogen. Die 184 Proben gehörten zu 181 unterschiedlichen Patienten. Um jeweils nur eine Probe pro Patient auswerten zu können, waren 181 Spots für die Analyse gültig. Das Material der 181 auswertbaren Spots stammte in 86 Fällen (47,5%) aus TURB-Proben und in 95 Fällen (52,5%) aus Zystektomiematerial.

6.1.1 Allgemeine Beschreibung der Kohorte: Verteilung von Alter, Geschlecht, Tumorstadium

Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 69,76 Jahre. Der jüngste Patient war 30 Jahre, der älteste Patient 89 Jahre alt. Von den 181 Patienten waren 41 Patienten (23%) weiblichen und 140 Patienten (77%) männlichen Geschlechts. Die Aufschlüsselung nach maximalem Tumorstadium ergab in absteigender Reihenfolge am häufigsten pT2-Tumoren (87 Fälle, 48% aller gültigen Fälle), gefolgt von pT3-Tumoren (67 Fälle, 37% aller gültigen Fälle) und pT4-Tumoren (27 Fälle, 15% aller gültigen Fälle). Genauer kann dies Abbildung 5 entnommen werden.

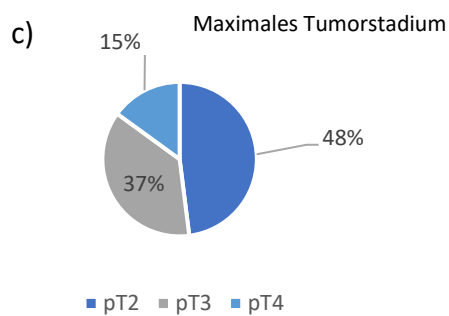
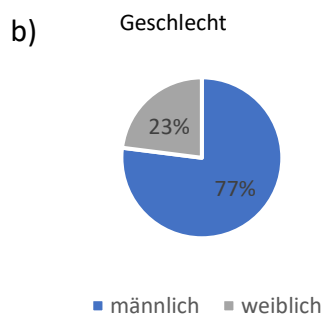
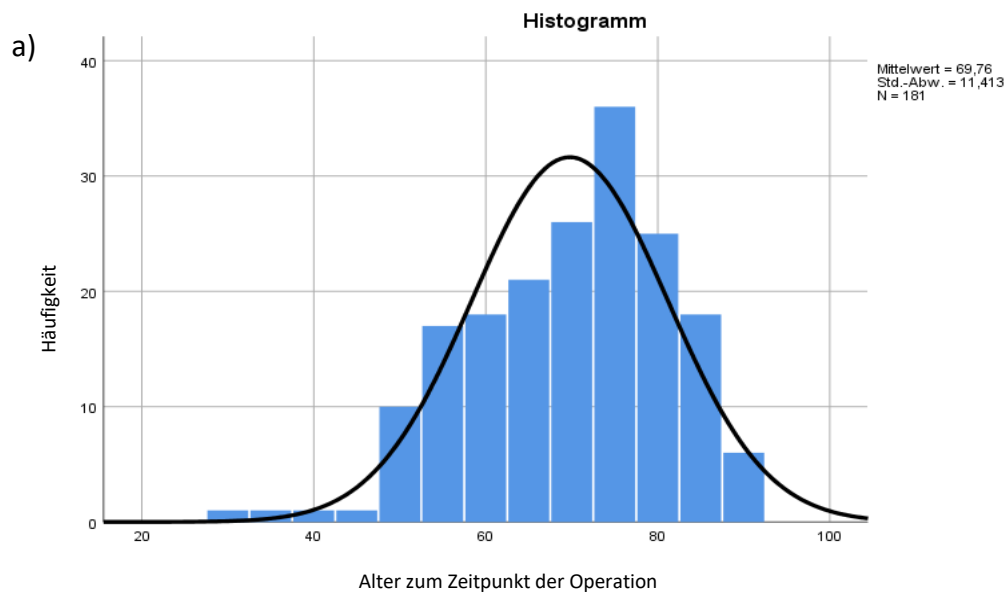


Abbildung 5 allgemeine Beschreibung der Studienkohorte: Alter, Geschlecht, Tumorstadium

Das Histogramm in Abbildung 5a) zeigt das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation von 69,76 Jahren. Die Kreisdiagramme zeigen die Geschlechts- (Abb. 5b) und Altersverteilung (Abb. 5c).

pT: maximales pathologisches Tumorstadium, Std.-Abw.: Standardabweichung

6.1.2 Histologische Subtypenverteilung

Die histologische Subtypenbestimmung wurde von zwei Uropathologen vorgenommen. Zunächst wurde die vorliegende Morphologie zur Benennung der histologischen Subtypen anhand aller Voll-H/E-Schnitte eines Patienten durch Frau Vanessa Henriques beurteilt. Nach Herstellung des TMAs bestimmte Herr Prof. Dr. med. Henning Reis die vorliegenden morphologischen Ausprägungen anhand der entsprechenden Spots der Patienten auf den H/E-Schnitten des hergestellten TMAs. Für sechs Spots konnte auf dem TMA kein eindeutig prädominanter histologischer Subtyp identifiziert werden. Für diese Fälle erfolgte zusätzlich eine Beurteilung der Vollschnitte. Teilweise divergente Befunde ergaben sich aufgrund der Heterogenität des Urothelkarzinoms. So kann ein Tumor an verschiedenen Lokalisationen unterschiedliche morphologische Ausprägungen haben und die Benennung des prädominanten histologischen Subtyps abweichen. Abbildung 6 zeigt Beispiele für die lichtmikroskopische Zuordnung einiger Fälle zu den entsprechenden Subtypen.

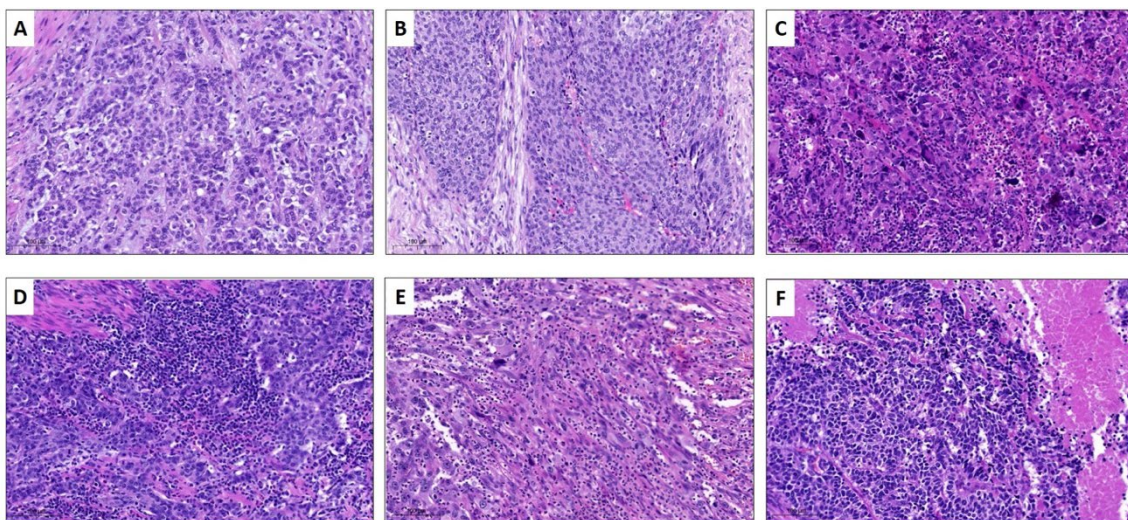


Abbildung 6 histologische Subtypenbestimmung anhand der ursprünglichen H/E-Schnitte: Beispiele¹²²

Abbildung 6 zeigt repräsentative Bilder der verschiedenen histologischen Subtypen auf den ursprünglichen H/E-Schnitten: A: NOS, B: NOS + squamös, C: schlecht differenziert / Riesenzellen, D: lymphoepithelial, E: sarkomatoid, F: neuroendokrin.

NOS = not otherwise specified = nicht weiter spezifiziert.

Insgesamt ergaben sich in der Kombination 131 Fälle vom NOS-Subtyp, 25 Fälle vom squamösen Subtyp, 9 Fälle mit mikropapillären Wuchsmuster und 4 neuroendokrine Tumoren. 12 weitere Fälle wiesen spezielle morphologische Eigenschaften auf: klarzellig (1x), lymphoepithelial (1x), riesenzellig (3x), sarkomatoid (3x), plasmazytoid (3x) und glandulär (1x). Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Verteilung der verschiedenen histologischen Subtypen innerhalb der Gesamtkohorte.

Tabelle 10 Verteilung der histologischen Subtypen innerhalb der Studienkohorte

Histologische Subtypen n (%)	
NOS (not otherwise specified)	131 (72)
squamös	25 (14)
mikropapillär	9 (5)
neuroendokrin	4 (2)
andere	12 (7)

Tabelle 10 zeigt, dass sich am häufigsten der „normale“-Subtyp (not otherwise specified, NOS), gefolgt vom squamösen, dem mikropapillären und dem neuroendokrinen Subtyp zeigte.

6.1.3 IHC-Klassifizierung

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte ebenfalls zunächst eine lichtmikroskopische Betrachtung der Färbeargebnisse. Abbildung 7 zeigt Beispiele für die lichtmikroskopische Auswertung der CK5/6, CK20, GATA3 und Synaptophysin Färbungen. Für diese Färbungen erfolgte eine Einteilung des Verteilungsmusters (Prozent der angefärbten Zellen) in die semiquantitativen Kategorien 0+ bis 3+.

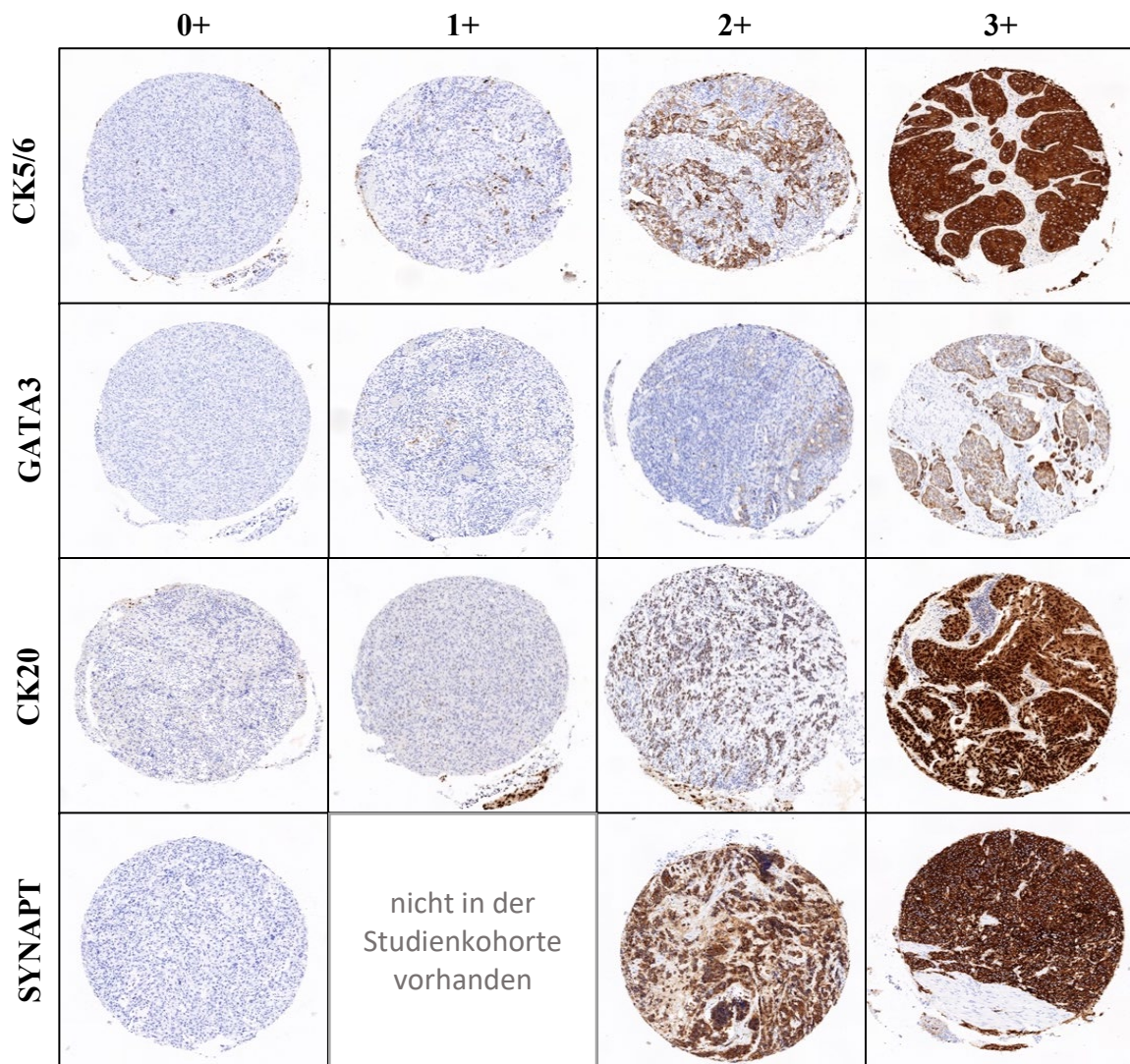


Abbildung 7 lichtmikroskopische Auswertung der CK5/6, CK20, GATA3 und SYNAPT IHC

In Abbildung 7 ist die lichtmikroskopische Auswertung der CK5/6, CK20, GATA3 und SYNAPT IHC dargestellt. Es erfolgte eine Einteilung des Verteilungsmusters (Prozent der angefärbten Zellen) in die Kategorien 0+ bis 3+. Für jede Färbung ist diese Einteilung beispielhaft dargestellt. Der Spotdurchmesser beträgt jeweils 1 mm.

Für die p53 Färbung wurde das Verteilungsmuster für jeden Spot bzw. Patienten in Prozent angegeben (Abb. 8).

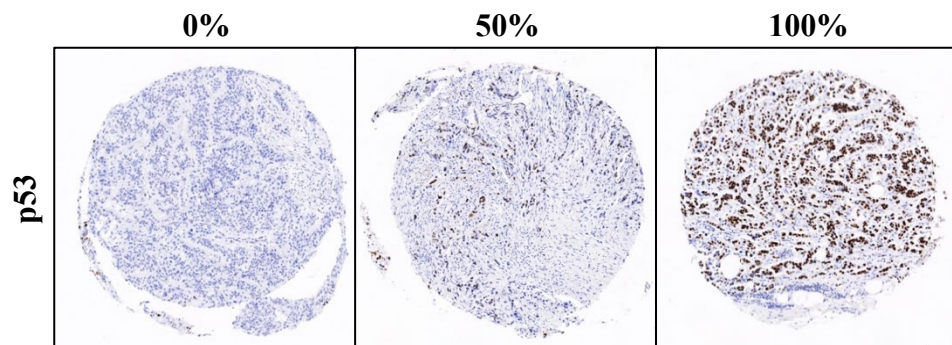


Abbildung 8 lichtmikroskopische Auswertung der IHC: Verteilungsmuster von p53

Abbildung 8 stellt die lichtmikroskopische Auswertung der p53-Immunhistochemie dar. Das Verteilungsmuster wurde für jeden Spot bzw. Patienten in Prozent angegeben. Die Abbildung zeigt jeweils beispielhaft einen Fall mit 0%, einen Fall mit 50% und einen Fall mit 100% Anfärbung. Der Spotdurchmesser beträgt jeweils 1 mm.

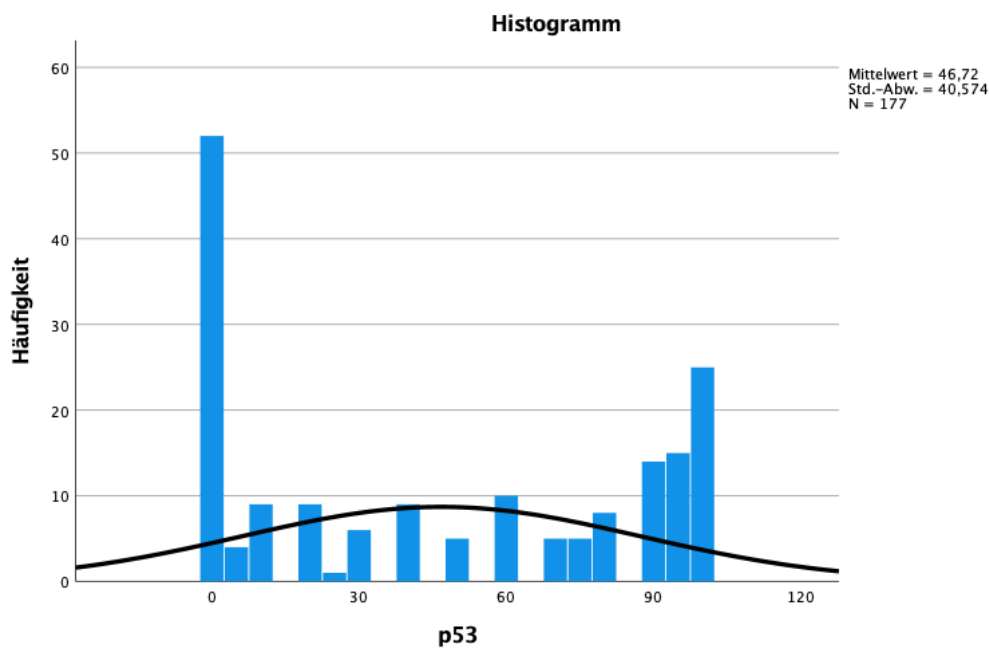


Abbildung 9 Histogramm der p53 Immunhistochemie

In Abbildung 9 ist das unterschiedliche Verteilungsmuster der p53-Färbung (x-Achse) in Bezug auf die Häufigkeit (y-Achse) dargestellt. Der Mittelwert beträgt 46,72%. Alle Angaben sind in Prozent.

Von den insgesamt 181 auswertbaren Spots waren 177 Spots (97,8%) für die Auswertung der CK5/6-IHC gültig, 177 Spots (97,8%) für die CK20-IHC, 173 Spots (95,6%) für die GATA3-IHC und 180 (99,4%) für die Synaptophysin-IHC. Dies veranschaulicht Tabelle 11.

Tabelle 11 Lichtmikroskopische Auswertung der gültigen und ausgeschlossenen Fälle für die IHC

n (%)	CK5/6	CK20	GATA3	SYNAPT
gültig	177 (97,8)	177 (97,8)	173 (95,6)	180 (99,4)
nicht auswertbar	4 (2,2)	4 (2,2)	8 (4,4)	1 (0,6)
gesamt	181	181	181	181

Tabelle 11 zeigt, dass von insgesamt 181 Fällen sowohl bei der CK5/6 als auch der CK20 IHC vier Fälle nicht ausgewertet werden konnten. Bei der GATA3 IHC wurden acht Fälle und bei der SYNAPT IHC ein Fall aus der Bewertung ausgeschlossen.

Die Häufigkeitsverteilung des IHC-Verteilungsmusters im Probenkollektiv der gültigen Fälle wird in Tabelle 12 und Abbildung 10 dargestellt. Innerhalb der CK5/6 Färbung wurden 79 Fälle (44,6%) der Kategorie 0+, 20 Fälle (11,3%) 1+, 30 Fälle (16,9%) 2+ und 48 Fälle (27,1%) der Kategorie 3+ zugeordnet.

Das Verteilungsmuster der CK20-IHC stellte sich folgendermaßen dar: Die meisten Fälle (139 Fälle, 78,5%) zeigten 0+. Kategorie 1+ bis 3+ waren ungefähr gleichmäßig verteilt. Es zeigten 15 Fälle (8,5%) Kategorie 1+, zwölf Fälle (6,8%) 2+ und elf Fälle (6,2%) 3+.

Innerhalb der GATA3-IHC wurden 15 Fälle (8,7%) der Kategorie 0+, 31 Fälle (17,9%) der Kategorie 1+, 32 Fälle (18,5%) der Kategorie 2+ und die Mehrzahl der Fälle (95 Fälle, 54,9%) der Kategorie 3+ zugeordnet.

Mittels Synaptophysin-Antikörper waren nur vier Fälle positiv; davon zeigte ein Fall (0,6%) eine mäßige (2+) und drei Fälle (1,7%) zeigten eine starke (3+) Immunreaktivität.

Tabelle 12 lichtmikroskopische Auswertung: Darstellung des Verteilungsmusters der IHC

IHC-Verteilungsmuster n (% der gültigen Fälle)				
	CK5/6	CK20	GATA3	SYNAPT
0+	79 (44,6)	139 (78,5)	15 (8,7)	176 (97,8)
1+	20 (11,3)	15 (8,5)	31 (17,9)	0 (0)
2+	30 (16,9)	12 (6,8)	32 (18,5)	1 (0,6)
3+	48 (27,1)	11 (6,2)	95 (54,9)	3 (1,7)
gesamt	177	177	173	180

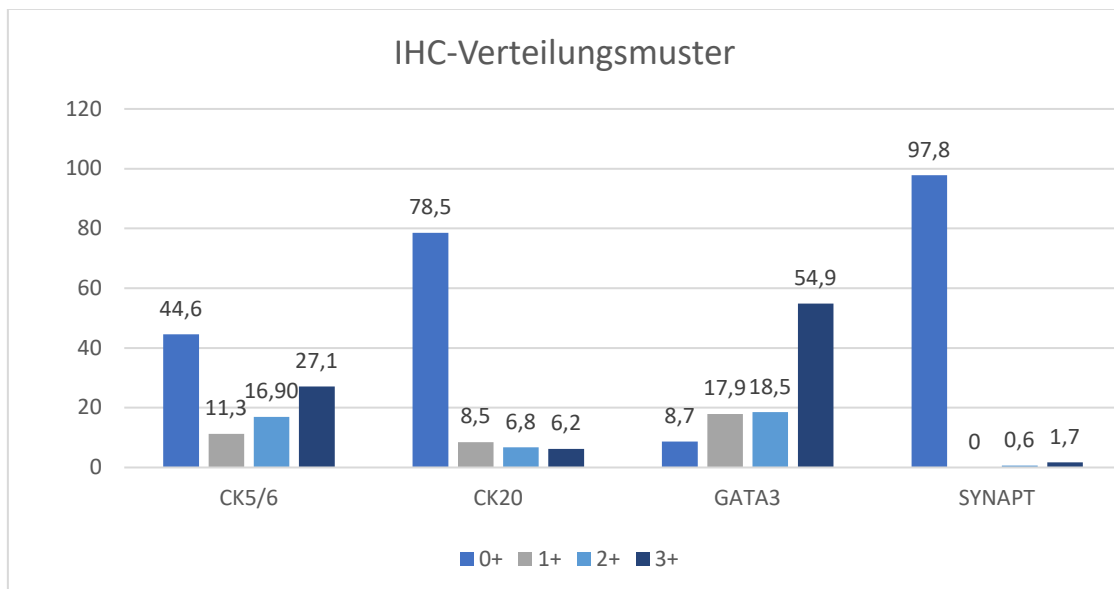


Abbildung 10 deskriptive Statistik: Verteilungsmuster von CK5/6, CK20, GATA3, SYNAPT

Tabelle 12 und Abbildung 10 verdeutlichen das Verteilungsmuster der CK5/6, CK20, GATA3 und SYNAPT Immunhistochemie. Alle Angaben in Prozent.

Für die folgenden statistischen Analysen wurden die Ergebnisse der Verteilungsmuster der einzelnen Färbungen in 1 = positiv und 0 = negativ zusammengefasst, sodass die Ergebnisse übersichtlich dargestellt werden konnten. Die IHC-Färbungen CK5/6, CK20, GATA3 und Synaptophysin wurden als positiv gewertet, wenn die Spots ein Verteilungsmuster der Kategorie 2+ und 3+ zeigten. 0+ und 1+ wurden als negativ gewertet. Die p53-Färbung wurde als positiv gewertet, wenn größer oder gleich 50% der Zellen angefärbt waren. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse innerhalb der

einzelnen immunhistochemischen Färbungen jeweils auf gleiche Weise veranschaulicht. Mittels Chi-Quadrat Tests wurde eine signifikante Assoziation der Immunmarker mit dem Geschlecht, dem maximalen pathologischen Tumorstadium und dem histologischen Subtyp auf Gleichverteilung getestet.

Für die Auswertung der CK5/6-IHC in Bezug auf das Geschlecht waren 177 Spots gültig. Davon gehörten 136 (76,8% aller gültigen Fälle) zu männlichen und 41 Spots (23,2% aller gültigen Fälle) zu weiblichen Patienten. Es waren insgesamt 78 Fälle (44% aller gültigen Fälle) CK5/6 positiv. Davon wiederum gehörten 52 Spots (29,4% aller gültigen Fälle) zu männlichen und 26 Spots (14,7% aller gültigen Fälle) zu weiblichen Patienten. CK5/6-positive Fälle waren damit signifikant mit dem weiblichen Geschlecht assoziiert (Chi-Quadrat, $p = 0,004$).

Für die Auswertung des maximalen Tumorstadiums waren 177 Fälle gültig. Davon waren 78 Fälle (44,1% aller gültigen Fälle) für CK5/6 positiv und 99 Fälle (55,9% aller gültigen Fälle) negativ. Es hatten 30 (16,9% aller gültigen Fälle) der CK5/6 positiven Fälle ein Stadium pT2, 38 (21,5% aller gültigen Fälle) ein Stadium pT3 und zehn (5,6% aller gültigen Fälle) ein Stadium pT4.

Bei der Betrachtung der histologischen Subtypen innerhalb der CK5/6 positiven Fälle war Folgendes zu verzeichnen. 176 Fälle waren gültig. Davon waren 78 Fälle (44,3% aller gültigen Fälle) für CK5/6 positiv und 98 Fälle (55,7% aller gültigen Fälle) für CK5/6 negativ. Innerhalb der für CK5/6 positiven Fälle zeigte sich am häufigsten der NOS-Subtyp (51 Fälle, 29% aller gültigen Fälle), gefolgt vom squamösen Subtyp (25 Fälle, 14,2% aller gültigen Fälle). Es war kein mikropapillärer oder neuroendokriner Subtyp CK5/6 positiv. Zwei Fälle zeigten andere Subtypen (1x riesenzellig, 1x sakromatoid; 1,1% aller gültigen Fälle).

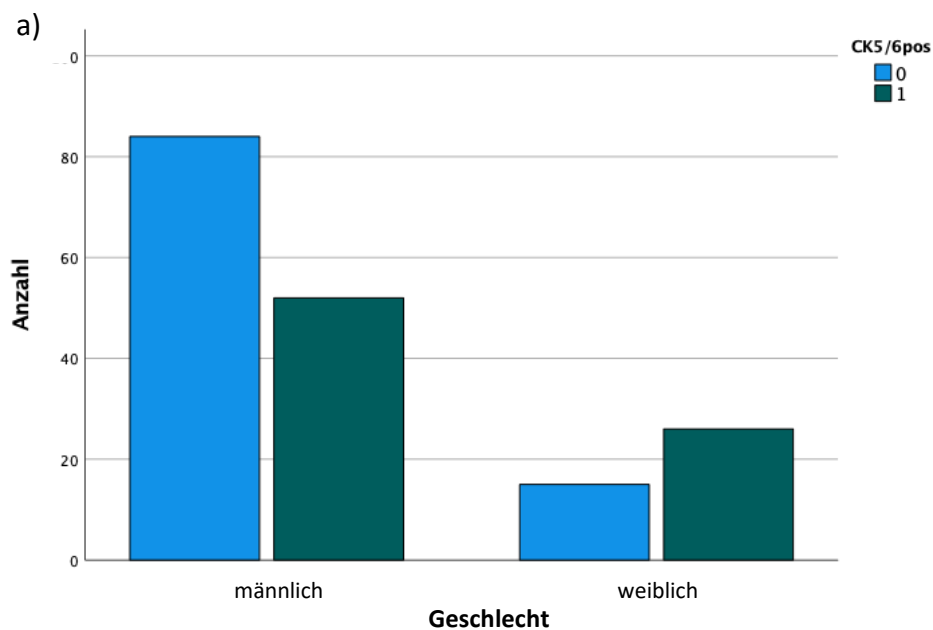
Für die CK5/6-Färbung können somit folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- 1) CK5/6-positive Fälle waren hochsignifikant mit dem weiblichen Geschlecht assoziiert (Chi-Quadrat $p = 0,004$).
- 2) CK5/6-positive Fälle waren hochsignifikant mit einer squamösen Differenzierung assoziiert (25 von 26 Fällen (96,1%) hatten eine positive CK5/6-Expression; Chi-Quadrat $p < 0,0001$).
- 3) Alle neun mikropapillären Fälle waren für den basalen Marker CK5/6 negativ.

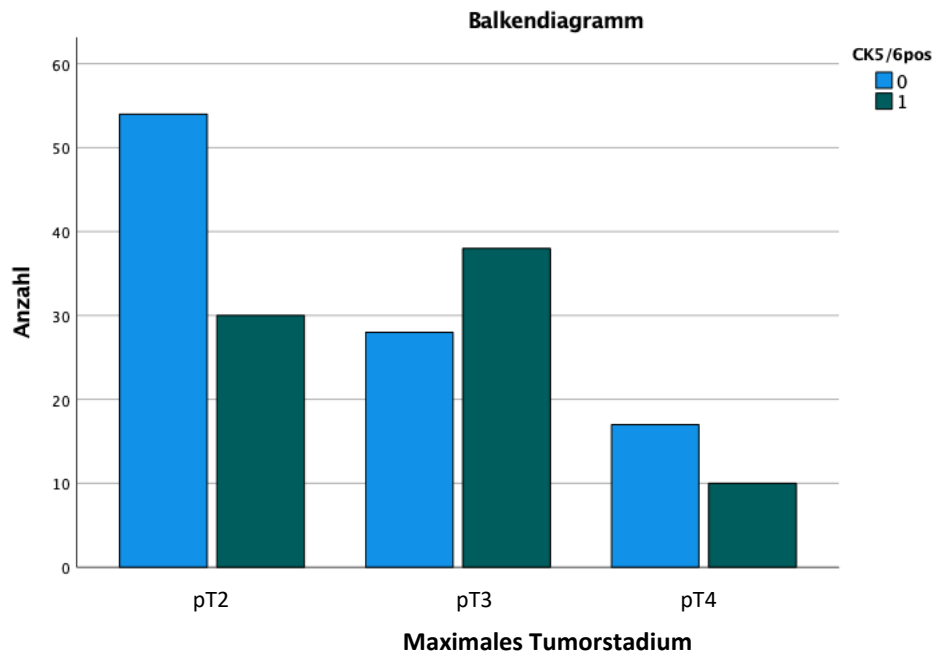
Tabelle 13 deskriptive Statistik der CK5/6-IHC

n (%)	gültig	fehlend	CK5/6+	CK5/6-	p
Geschlecht	177 (100)	4	78 (44)	99 (56)	0,004
männlich	136 (77)		52	84	
weiblich	41 (23)		26	15	
pT-Stadium	177 (100)	4	78 (44)	99 (56)	0,020
pT2	84 (48)		30	54	
pT3	66 (37)		38	28	
pT4	27 (15)		10	17	
Histologischer Subtyp	176 (100)	5	78 (44)	98 (56)	<0,001
NOS	124 (71)		51	73	
squamös	26 (15)		25	1	
mikropapillär	9 (5)		0	9	
neuroendokrin	4 (2)		0	4	
andere	13 (7)		2	11	

T-Stadium: Tumorstadium, pT: maximales pathologisches Tumorstadium, NOS: nicht weiter spezifiziert.



b)



c)

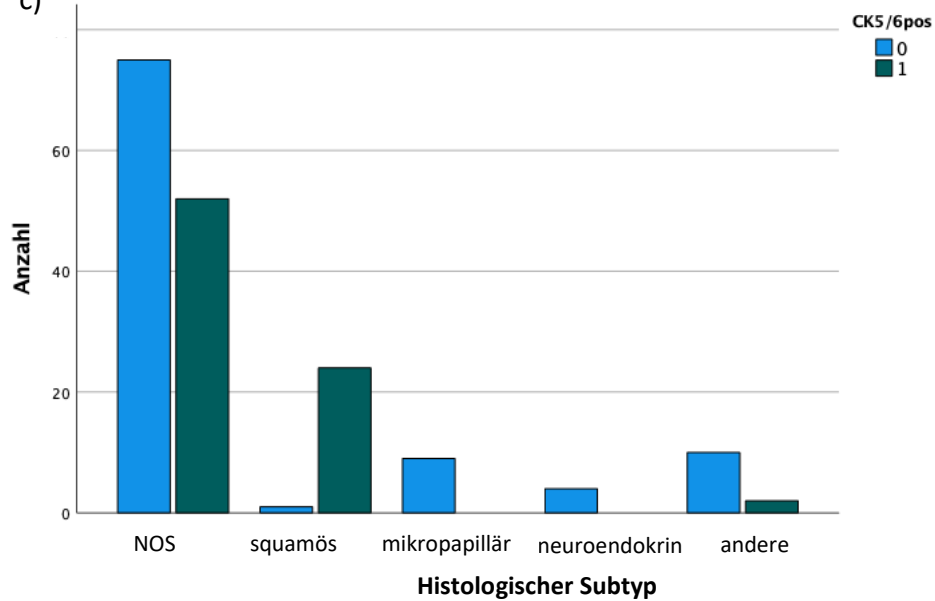


Abbildung 11 Darstellung der deskriptiven Statistik der CK5/6-IHC

Abbildung 11 zeigt eine Darstellung der Ergebnisse der CK5/6-IHC: Assoziation von positiver CK5/6-IHC mit a) Geschlecht, b) maximalem Tumorstadium und c) histologischem Subtyp

CK5/6pos: CK5/6-Positivität

In die Auswertung der CK20-IHC in Bezug auf das Geschlecht wurden 177 Fälle eingeschlossen (136 Spots (76,8% aller gültigen Fälle) männlich, 41 Spots (23,2% aller gültigen Fälle) weiblich). Insgesamt waren 23 Fälle (13% aller gültigen Fälle) für CK20 positiv. Davon gehörten 18 Fälle (10,2% aller gültigen Fälle) zu männlichen und fünf Fälle (2,8% aller gültigen Fälle) zu weiblichen Patienten. Das Verteilungsmuster des pT-Stadiums innerhalb der CK20 positiven Proben stellte sich wie folgt dar: 177 Fälle waren gültig. Davon waren 23 Fälle (13% aller gültigen Fälle) für CK20 positiv und 154 Fälle (87% aller gültigen Fälle) negativ. 15 der positiven Fälle (8,5% aller gültigen Fälle) zeigten ein Stadium pT2, fünf Fälle (2,8% aller gültigen Fälle) ein Stadium pT3 und drei Fälle (1,7% aller gültigen Fälle) ein Stadium pT4. Bei der Betrachtung der histologischen Subtypen wurden 176 Fälle ausgewertet. 22 Fälle (12,5% aller gültigen Fälle) waren für CK20 positiv und 154 Fälle (87,5% aller gültigen Fälle) negativ. Innerhalb der für CK20 positiven Fälle zeigte sich am häufigsten der NOS-Subtyp (17 Fälle, 9,7% aller gültigen Fälle), gefolgt vom squamösen (2 Fälle, 1,1% aller gültigen Fälle) und dem mikropapillären Subtyp (2 Fälle, 1,1%). Es war kein Fall des neuroendokrinen Subtyps für CK20 positiv. Ein Fall zeigte einen anderen Subtyp (1x riesenzellig; 0,6% aller gültigen Fälle). Insgesamt lieferte die statistische Auswertung der CK20-Färbung keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 14 deskriptive Statistik der CK20-IHC

n (%)	gültig	fehlend	CK20+	CK20-	p
Geschlecht	177 (100)	4	23 (13)	154 (87)	0,86
männlich	136 (77)		18	118	
weiblich	41 (23)		5	36	
T-Stadium	177 (100)	4	23 (13)	154 (87)	0,17
pT2	84 (48)		15	69	
pT3	66 (37)		5	61	
pT4	27 (15)		3	24	
Histologischer Subtyp	176 (100)	5	22 (13)	154 (87)	0,69
NOS	124 (71)		17	107	
squamös	26 (15)		2	24	
mikropapillär	9 (5)		2	7	
neuroendokrin	4 (2)		-	4	
andere	13 (7)		1	12	

pT-Stadium: Tumorstadium, pT: maximales pathologisches Tumorstadium, NOS: nicht weiter spezifiziert

Für die Auswertung der GATA3-IHC bezüglich des Geschlechts waren 173 Fälle gültig. 132 Fälle (76,3% aller gültigen Fälle) stammten von männlichen Patienten. 41 Fälle (23,7% aller gültigen Fälle) gehörten zu weiblichen Patienten. 127 Spots waren für GATA3 positiv (96 männliche Proben (55,5% aller gültigen Fälle), 31 weibliche Proben (17,9% aller gültigen Fälle)).

Für die Auswertung des maximalen Tumorstadiums in Bezug zu GATA3-Positivität waren ebenfalls 173 Fälle gültig. Davon waren 127 Fälle (73,4% aller gültigen Fälle) für GATA3 positiv und 46 Fälle (26,6% aller gültigen Fälle) negativ. Von den 127 positiven Fällen zeigten 64 Fälle (37% aller gültigen Fälle) ein Stadium pT2, 43 Fälle (24,9% aller gültigen Fälle) ein Stadium pT3 und 20 Fälle (11,6% aller gültigen Fälle) ein Stadium pT4.

Bei der Betrachtung der histologischen Subtypen innerhalb der GATA3-Färbung ist Folgendes zu verzeichnen: 172 Fälle waren gültig. Davon waren 126 Fälle (73,3% aller gültigen Fälle) für GATA3 positiv und 46 Fälle (26,7% aller gültigen Fälle) negativ. Innerhalb der für GATA3 positiven Fälle zeigte sich am häufigsten der NOS-Subtyp (97 Fälle, 56,4% aller gültigen Fälle), gefolgt vom squamösen (12 Fälle, 7% aller gültigen Fälle) und dem mikropapillären Subtyp (9 Fälle, 5,2%). Alle neuroendokrinen Fälle waren für GATA3 negativ. Acht Fälle zeigten andere Subtypen (riesenzellig (2x), sarkomatoid (2x), plasmazytoid (3x) und glandulär (1x); 4,7% aller gültigen Fälle).

Für die GATA3-Färbung können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- 1) Alle mikropapillären Fälle waren GATA3 positiv.
- 2) Alle neuroendokrinen Fälle waren GATA3 negativ.
- 3) Die Hälfte der squamösen Fälle war GATA3 positiv.

Tabelle 15 deskriptive Statistik der GATA3-IHC

n (%)	gültig	fehlend	GATA3+	GATA3-	p
Geschlecht	173 (100)	8	127 (73)	46 (27)	0,72
männlich	132 (76)		96	36	
weiblich	41 (24)		31	10	
T-Stadium	173 (100)	8	127 (73)	46 (27)	0,22
pT2	81 (47)		64	17	
pT3	65 (38)		43	22	
pT4	27 (16)		20	7	
Histologischer Subtyp	172 (100)	9	126 (73)	46 (27)	<0,001
NOS	122 (71)		97	25	
squamös	24 (14)		12	12	
mikropapillär	9 (5)		9	0	
neuroendokrin	4 (2)		-	4	
andere	13 (7)		8	5	

pT-Stadium: Tumorstadium, pT: maximales pathologisches Tumorstadium, NOS: nicht weiter spezifiziert

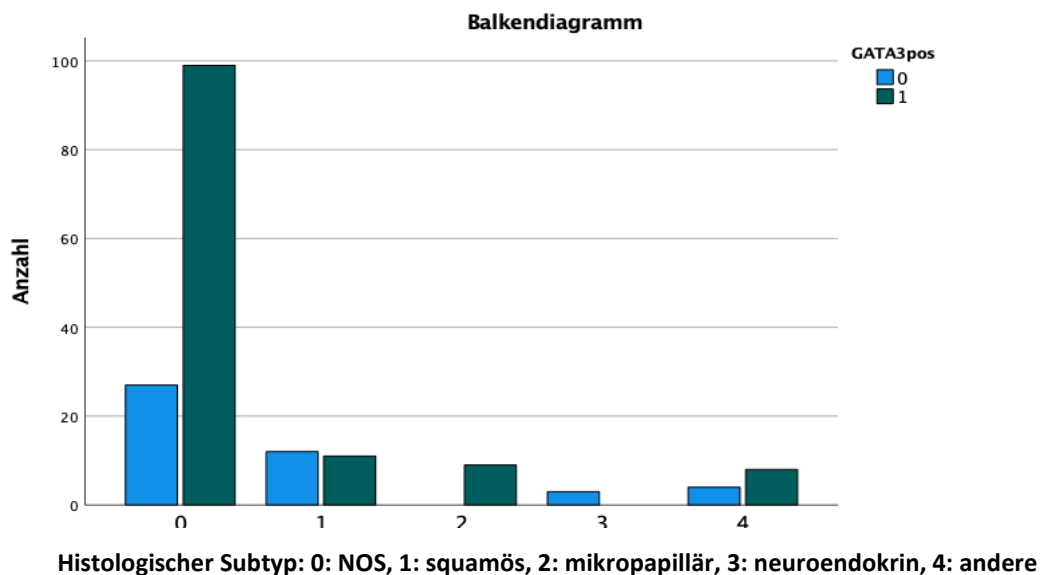


Abbildung 12 Darstellung der deskriptiven Statistik der GATA3-IHC

Abbildung 12 zeigt eine Darstellung der Assoziation von positiver GATA3-IHC und histologischem Subtyp. GATA3pos: GATA3-Positivität, NOS: nicht weiter spezifiziert.

Für die Bewertung der p53-IHC in Bezug zum Geschlecht waren 177 Fälle gültig (136 (76,8% aller gültigen Fälle) männliche und 41 (23,2% aller gültigen Fälle) weibliche Proben). 87 Proben waren für p53 positiv. Davon gehörten 67 Proben (37,9% aller gültigen Fälle) zu männlichen und 20 Proben (11,3% aller gültigen Fälle) zu weiblichen Patienten. Die Verteilung des maximalen Tumorstadiums innerhalb der p53-Färbung stellte sich folgendermaßen dar: 177 Fälle waren gültig. Davon waren 87 Fälle (49,2% aller gültigen Fälle) für p53 positiv und 90 Fälle (50,8% aller gültigen Fälle) negativ. Von den 87 positiven Fällen zeigten 45 Fälle (25,4% aller gültigen Fälle) ein pT2, 32 Fälle (18,1% aller gültigen Fälle) ein pT3 und zehn Fälle (5,6% aller gültigen Fälle) ein pT4 Stadium. Bei der Betrachtung der histologischen Subtypen innerhalb der p53-Färbung ist Folgendes zu verzeichnen: 176 Fälle waren gültig. Davon waren 86 Fälle (48,9% aller gültigen Fälle) für p53 positiv und 90 Fälle (51,1% aller gültigen Fälle) negativ. Innerhalb der für p53 positiven Fälle zeigte sich am häufigsten der NOS-Subtyp (67 Fälle, 38,1 % aller gültigen Fälle). 17 (9,7% aller gültigen Fälle) von 25 (14,2% aller gültigen Fälle) squamösen Fällen waren negativ. Drei von neun mikropapillären waren für p53 positiv (1,7% aller gültigen Fälle). Zwei (1,1% aller gültigen Fälle) der vier (2,3% aller gültigen Fälle) neuroendokrinen Fälle waren positiv und zwei negativ. Sechs der 13 anderen Subtypen waren positiv (lymphoepithelial (1x), riesenzellig (3x), sarkomatoid (1x), plasmazytoid; 3,4 % aller gültigen Fälle). Insgesamt lieferte die Auswertung der p53-Färbung keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 16 deskriptive Statistik der p53-IHC

n (%)	gültig	fehlend	p53+	p53-	p
Geschlecht	177 (100)	4	87 (49)	90 (51)	0,96
männlich	136 (77)		67	69	
weiblich	41 (23)		20	21	
T-Stadium	177 (100)	4	87 (49)	90 (51)	0,32
pT2	84 (46)		45	39	
pT3	66 (37)		32	34	
pT4	27 (15)		10	17	
Histologischer Subtyp	176 (100)	5	86 (49)	90 (51)	0,55
NOS	125 (71)		67	58	
squamös	25 (14)		8	17	
mikropapillär	9 (5)		1	6	
neuroendokrin	4 (2)		2	2	
andere	13 (7)		6	7	

pT-Stadium: Tumorstadium, pT: maximales pathologisches Tumorstadium, NOS: nicht weiter spezifiziert, p53+: $\geq 50\%$ der Tumorzellkerne angefärbt, p53-: $<50\%$ der Tumorzellkerne angefärbt.

Bei der Synaptophysin-IHC waren 180 Spots bzgl. des Geschlechts und des Tumorstadiums und 179 Spots bzgl. des histologischen Subtyps auswertbar. 139 Spots (77,2% aller gültigen Fälle) gehörten zu männlichen Patienten und 41 Spots (22,8% aller gültigen Fälle) zu weiblichen. Es waren vier Fälle Synaptophysin positiv. Alle vier (2,2% aller gültigen Fälle) betroffenen Patienten waren männlich. Es konnte keine Signifikanz zwischen dem Geschlecht und einer Synaptophysin-Positivität gezeigt werden ($p = 0,27$). Zwei der positiven Fälle (1,1% aller gültigen Fälle) hatten ein Stadium pT2, die beiden anderen (1,1% aller gültigen Fälle) ein pT3 Stadium. Von den vier Fällen (2,2% aller gültigen Fälle), die eine Synaptophysin-Positivität zeigten, war ein Fall (0,6% aller gültigen Fälle) vom NOS-Subtyp und drei Fälle (1,7% aller gültigen Fälle) vom neuroendokrinen Subtyp. Der Chi-Quadrat-Test ergab hierfür ein hochsignifikantes Ergebnis von $p < 0,001$.

Tabelle 17 deskriptive Statistik der Synaptophysin-IHC

n (%)	gültig	fehlend	SYNAPT+	SYNAPT-	p
Geschlecht	180 (100)	1	4 (2)	176 (98)	0,27
männlich	139 (77)		4	135	
weiblich	41 (23)		-	41	
T-Stadium	180 (100)	1	4 (2)	176 (98)	0,67
pT2	87 (48)		2	85	
pT3	66 (37)		2	64	
pT4	27 (15)		-	27	
Histologischer Subtyp	179 (100)	1	4 (2)	175 (98)	<0,001
NOS	127 (71)		1	126	
squamös	26 (15)		-	26	
mikropapillär	9 (5)		-	9	
neuroendokrin	4 (2)		4	0	
andere	13 (7)		-	13	

pT-Stadium: Tumorstadium, pT: maximales pathologisches Tumorstadium, NOS: nicht weiter spezifiziert.

Da die bisherigen Ergebnisse einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CK5/6 bzw. der GATA3 Färbung und dem histologischen Subtyp gezeigt haben und in der Literatur eine auf diesen zwei Markern basierte IHC-Klassifikation bereits mehrfach beschrieben wurde, konzentrierte sich die Auswertung in einem nächsten Schritt auf diese beiden Färbungen. Bei Betrachtung aller Fälle der Gesamtkohorte bezüglich der CK5/6- und GATA3-Färbeergebnisse wurde eine Einteilung in vier Gruppen, welche bereits aus vorherigen Studien bekannt sind, deutlich. Neben der singulären Positivität von CK5/6 und GATA3 gab es eine Gruppe von Fällen mit Positivität beider Färbungen sowie eine Gruppe mit Negativität beider Färbungen (repräsentative Bilder in Abbildung 13).

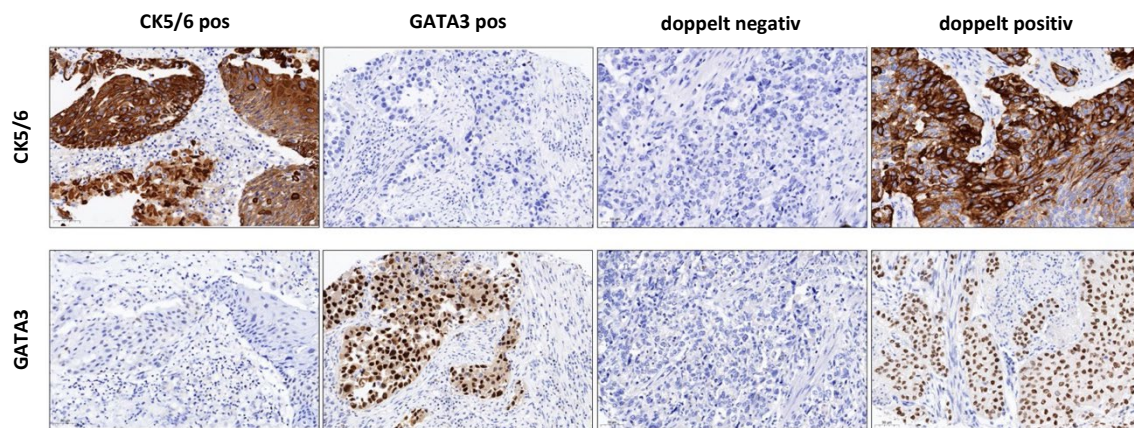


Abbildung 13 lichtmikroskopische Auswertung: Kombination der CK5/6 und GATA3-IHC

Abbildung 13 zeigt repräsentative Bilder der vier Gruppen: CK5/6-positive, GATA3-positive, doppelt negative und doppelt positive Fälle (Vergrößerung 200×).

Tabelle 18 und Abbildung 14 zeigen unsere Ergebnisse diesbezüglich. 176 Fälle waren sowohl für CK5/6 als auch für GATA3 auswertbar. Davon zeigen 32 Fälle (18% aller auswertbaren Fälle) singuläre Positivität für CK5/6 und 81 Fälle (46% aller auswertbaren Fälle) für GATA3. Doppelt positiv waren 46 Fälle (26% aller auswertbaren Fälle). 17 Fälle (10% aller auswertbaren Fälle) zeigten sich doppelt negativ. Bei Kombination dieser Ergebnisse mit den histologischen Subtypen innerhalb der vier Gruppen können folgende Aussagen gemacht werden:

- 1) Alle histologisch neuroendokrinen Fälle waren doppelt-negativ.
- 2) Alle histologisch mikropapillären Fälle waren singulär GATA3 positiv.

3) Die Mehrzahl der squamös differenzierten Fälle war singulär CK5/6 positiv, gefolgt von doppelter Negativität und lediglich einem Fall in der Gruppe, der nur GATA3 positiv war.

4) Der NOS-Subtyp war auf alle vier Gruppen verteilt.

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der vier Gruppen in Bezug zu klinischen und pathologischen Daten zusammengefasst.

Tabelle 18 Zusammenfassung der Ergebnisse der Gesamtkohorte

		n (%)	CK5/6 positiv	GATA3 positiv	Doppelt negativ	Doppelt positiv	p
Alter	< 70	73 (41)	15 (47)	29 (36)	9 (53)	20 (44)	0,5
	≥ 70	103 (59)	17 (53)	52 (64)	8 (47)	26 (15)	
Geschlecht	männlich	135 (77)	23 (72)	67 (83)	16 (94)	29 (63)	0,02
	weiblich	41 (23)	9 (28)	14 (17)	1 (6)	17 (37)	
max. T-Stadium	pT2	83 (47)	11 (34)	45 (56)	8 (47)	19 (41)	0,14
	pT3	66 (38)	18 (56)	23 (28)	5 (29)	20 (44)	
	pT4	27 (15)	3 (10)	13 (16)	4 (24)	7 (15)	
histologischer Subtyp	NOS	126 (72)	18 (59)	64 (80)	9 (53)	34 (74)	<0,001
	squamös	25 (14)	14 (44)	1 (1)	-	10 (22)	
	mikropapillär	9 (5)	-	9 (11)	-	-	
	neuroendokrin	4 (2)	-	-	4 (24)	-	
	andere	12 (7)	-	6 (8)	4 (24)	2 (4)	

Tabelle 18 zeigt alle Ergebnisse der CK5/6 und GATA3 Färbung. Alle histologisch neuroendokrinen Fälle waren doppelt-negativ. Alle histologisch mikropapillären Fälle waren singulär GATA3 positiv. Die Mehrzahl der squamösen Fälle war singulär CK5/6 positiv, gefolgt von doppelter Negativität und lediglich einem Fall in der Gruppe, der nur für GATA3 positiv war. Der NOS-Subtyp war auf alle vier Gruppen verteilt.

pT-Stadium: Tumorstadium, pT: maximales pathologisches Tumorstadium, NOS: nicht weiter spezifiziert

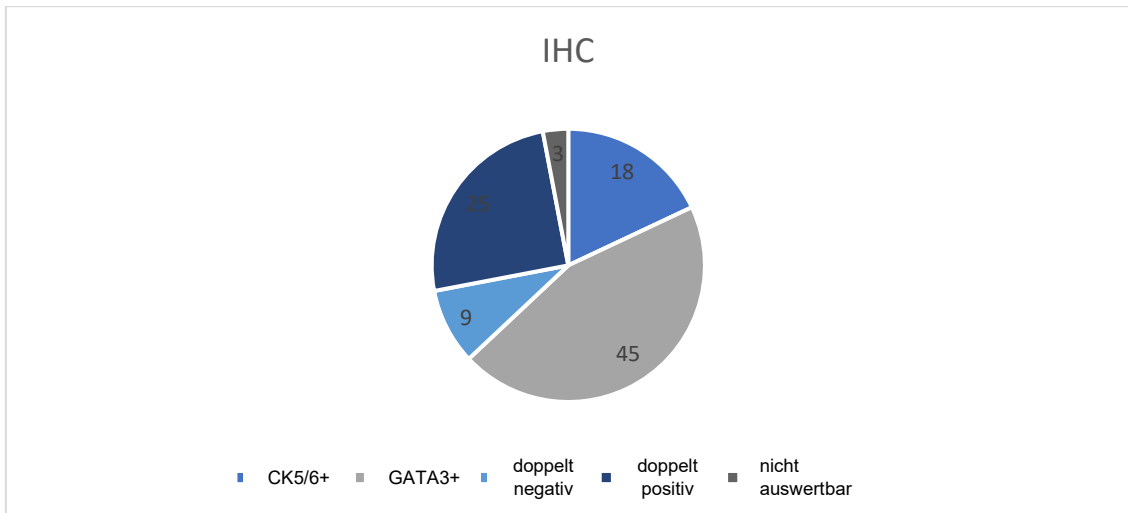


Abbildung 14 deskriptive Statistik: Kombination der Ergebnisse von CK5/6 und GATA3

Abbildung 14 zeigt, dass die Mehrheit der Patientenproben nur für GATA3 positiv war (45%), gefolgt von doppel positiven (25%), CK5/6 positiven (18%) und doppel negativen (9%) Fällen. Alle Angaben in Prozent.

6.2 Subgruppenanalyse: Zystektomie Überlebensanalyse

6.2.1 Allgemeine Beschreibung der Kohorte der Subgruppe

Für diese Subgruppenanalyse wurden nur Patienten ausgewählt, die eine radikale Zystektomie in kurativer Absicht (zum Zeitpunkt der Zystektomie nicht fernmetastasiert) am Universitätsklinikum Frankfurt erhielten und von denen angemessene Nachsorgedaten vorhanden waren; dies waren 110 Zystektomie-Proben der insgesamt 186 Proben auf dem TMA. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 66 Monate (IQR 34-98 Monate). Davon erhielten 75 Patienten eine alleinige Zystektomie ohne perioperative Chemotherapie, während 35 Patienten zusätzlich zur Zystektomie mindestens zwei Zyklen einer adjuvanten Chemotherapie erhielten.

In der Gruppe der „nur“ zystektomierten Patienten betrug das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Operation 72 Jahre (IQR 64,25-76,75). 16 Patienten (21%) waren weiblichen und 59 Patienten (79%) männlichen Geschlechts. 23 Patienten (31%) hatten ein Stadium pT2, 37 Patienten (49%) ein Stadium pT3 und 15 Patienten (20%) ein Stadium pT4. Der Lymphknotenstatus war folgendermaßen verteilt: 42 Patienten (56%) waren nodal negativ (pN0) und 33 Patienten (44%) waren entweder pN1 oder pNx. Von den 75 zystektomierten Patienten waren 60 Präparate (80%) lokal R0 (lokale Exzision im Gesunden) und 15 Proben (20%) wurden als R1, R2 oder Rx klassifiziert. Die histologischen Subtypen waren wie folgt verteilt: 57 Proben (77%) zeigten den NOS-Subtyp, acht Proben (11%) den squamösen, fünf Proben (7%) den mikropapillären, eine Probe (1%) den neuroendokrinen Subtyp und drei Proben (4%) wurden anderen Subtypen zugeordnet. Dokumentierte Tumorrezidive traten bei 21 (28%) Patienten auf. Die IHC-Färbung war folgendermaßen verteilt: 14 Spots (19%) waren CK5/6 positiv, 36 Spots (48%) GATA3 positiv, sieben Spots (9%) sowohl CK5/6 als auch GATA3 negativ und 18 Spots (24%) für beide Färbungen positiv.

In der Gruppe der 35 Patienten mit Zystektomie und adjuvanter Chemotherapie betrug das mediane Alter zum Zeitpunkt der Operation 60 Jahre (IQR 52,75-71). Sieben Patienten (20%) waren weiblichen und 28 Patienten (80%) männlichen Geschlechts. Fünf Proben (14%) zeigten ein Stadium pT2, 24 Proben (69%) ein Stadium pT3 und sechs Proben (17%) ein pT4 Stadium. Der Lymphknotenstatus war folgendermaßen verteilt: 13 Patienten (37%) waren nodal negativ (pN0), 22 Patienten (63%) waren entweder pN1 oder pNx. Von den 35 Patienten mit Zystektomie und adjuvanter Chemotherapie waren 28 Präparate (80%) lokal R0 und sieben

Proben (20%) wurden als R1, R2 oder Rx klassifiziert. Die histologischen Varianten waren wie folgt verteilt: 23 Proben (66%) zeigten den NOS-Subtyp, vier Proben (11%) den squamösen, zwei Proben (6%) den mikropapillären, zwei Proben (6%) den neuroendokrinen Subtyp und vier Proben (11%) wurden anderen Subtypen zugeordnet. Bei 18 Patienten (51%) rezidierte der Tumor nicht und bei 17 Patienten (49%) trat ein Rezidiv auf. Die IHC-Färbung zeigte sich folgendermaßen verteilt: Fünf Spots (15%) waren CK5/6 positiv, 13 Spots (38%) GATA3 positiv, sechs Spots (18%) sowohl CK5/6 als auch GATA3 negativ und zehn Spots (29%) waren für beide Färbungen positiv. Von den 35 Patienten mit Zystektomie und adjuvanter Chemotherapie erhielten 28 (80%) eine Gemcitabin/Cisplatin Chemotherapie, vier Patienten (11%) eine Gemcitabin/Carboplatin Chemotherapie und zwei Patienten (6%) eine Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid. Ein Patient (3%) wurde mit einer anderen Kombination behandelt. Alle hier aufgeführten Ergebnisse sind in **Tabelle 19** zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 19 Zusammenfassung der Ergebnisse der Subgruppenanalyse

		nur Zystektomie n = 75	adjuvante Chemotherapie n= 35	p
Alter (IQR)		72 (64,25-76,75)	60 (52,75-71)	
Alter	< 71	32 (43)	26 (74)	0,002
	≥ 71	43 (57)	9 (26)	
Geschlecht	männlich	59 (79)	28 (80)	1,0
	weiblich	16 (21)	7 (20)	
max. pT-Stadium	pT2	23 (31)	5 (14)	0,12
	pT3	37 (49)	24 (69)	
	pT4	15 (20)	6 (17)	
Lymphknotenstatus	pN0	42 (56)	13 (37)	0,08
	pN1 + pNx	33 (44)	22 (63)	
R-Status	R0	60 (80)	28 (80)	1,0
	R1/R2/Rx	15 (20)	7 (20)	
histologischer Subtyp	NOS	57 (77)	23 (66)	0,39
	squamös	8 (11)	4 (11)	
	mikropapillär	5 (7)	2 (6)	
	neuroendokrin	1 (1)	2 (6)	
	andere	3 (4)	4 (11)	
Typ der Chemotherapie	Gem/Cis	-	28 (80)	0,06
	Gem/Carbo	-	4 (11)	
	Platin/Etoposid	-	2 (6)	
	andere	-	1 (3)	
Rezidiv	nein	54 (72)	18 (51)	0,06
	ja	21 (28)	17 (49)	
IHC-Status	CK5/6 pos.	14 (19)	5 (15)	0,45
	GATA3 pos.	36 (48)	13 (38)	
	doppelt neg.	7 (9)	6 (18)	
	doppelt pos.	18 (24)	10 (29)	

Tabelle 19 stellt eine Übersicht aller Ergebnisse der beiden Untergruppen „nur Zystektomie“ (Gruppe 1) und „Zystektomie und adjuvante Chemotherapie“ (Gruppe 2) dar.

IQR: Interquartilsabstand, T-Stadium: Tumorstadium, pT: maximales pathologisches Tumorstadium, pN: maximales pathologisches Lymphknotenstadium, x: nicht beurteilbar, R-Status: Residual-Status, Gem/Cis: Gemcitabin/Cisplatin, Gem/Carbo: Gemcitabin/Carboplatin, IHC-Status: Immunhistochemie-Status.

6.2.2 Kaplan-Meier-Kurven der Subgruppenanalyse

Das Ziel der Überlebensanalyse nach Kaplan und Meier war es, einen möglichen prognostischen Effekt der untersuchten Variablen aufzuzeigen. Hierfür wurde an Kaplan-Meier-Überlebenskurven untersucht, ob zwischen den jeweiligen Variablen (maximales Tumor- und Lymphknotenstadium, adjuvante Chemotherapie, histologischer Subtyp) und dem Gesamtüberleben (Overall Survival (OS)) ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht. Hierbei zeigte sich für alle Variablen außer dem histologischen Subtyp eine auf dem 0,05-Niveau signifikante Korrelation mit dem OS.

Schlüsselt man die Patienten nach maximalem Tumorstadium auf und betrachtet das mittlere OS in der jeweiligen Gruppe, ist eine Abhängigkeit des OS vom maximalen Tumorstadium ersichtlich (Abb. 15). Patienten mit einem maximalen Tumorstadium von pT2 hatten ein signifikant längeres OS (medianes OS 98 Monate, 95% KI 28-NA) als Patienten mit einem pT3-Stadium (medianes OS 18 Monate, 95% KI 11-32) bzw. solche mit einem pT4-Stadium (medianes OS 6 Monate, 95% KI 4-21). Der Einfluss des maximalen Tumorstadiums auf das OS war hochsignifikant (p (logrank) < 0,001).

Ebenso stellte sich eine Abhängigkeit von OS und Lymphknotenstatus dar (Abb. 16). Patienten mit einem negativen Lymphknotenstatus von pN0 (medianes OS 32 Monate, 95% KI 18-NA) zeigten im Mittel ein signifikant längeres OS als Patienten mit einem pN+/pNx-Status (medianes OS 11 Monate, 95% KI 7-22); diese Assoziation war ebenfalls hochsignifikant (p (logrank) = 0,001).

Neben dem maximalen Tumor- und Lymphknotenstadium zeigte auch die Therapie mit einer adjuvanten Chemotherapie einen signifikanten Zusammenhang (p (logrank) = 0,02). Dies ist in Abbildung 17 dargestellt. Patienten, die mit einer adjuvanten Chemotherapie (medianes OS 32 Monate, 95% KI 25-NA) behandelt wurden, zeigten ein längeres OS als Patienten, die keine adjuvante Chemotherapie (medianes OS 12 Monate, 95% KI 8-28) erhalten hatten.

Die Assoziation des OS mit dem IHC-Status zeigt Abbildung 18. Hier konnte kein signifikanter Zusammenhang des OS mit der Immunreaktivität des Tumors für die untersuchten Antikörper festgestellt werden (p (logrank) = 0,65). Das schlechteste OS zeigte mit Abstand die Kurve der doppelt negativen Fälle (medianes OS 11 Monate, 95% KI 2-NA). Die Kurven der CK5/6 positiven Fälle (medianes OS 28 Monate, 95% KI 9-NA), der GATA3 positiven Fälle (medianes OS 21 Monate, 95% KI 10-53) und der doppelt positiven Fälle (medianes OS 28 Monate, 95% KI 7-NA) unterschieden sich kaum.

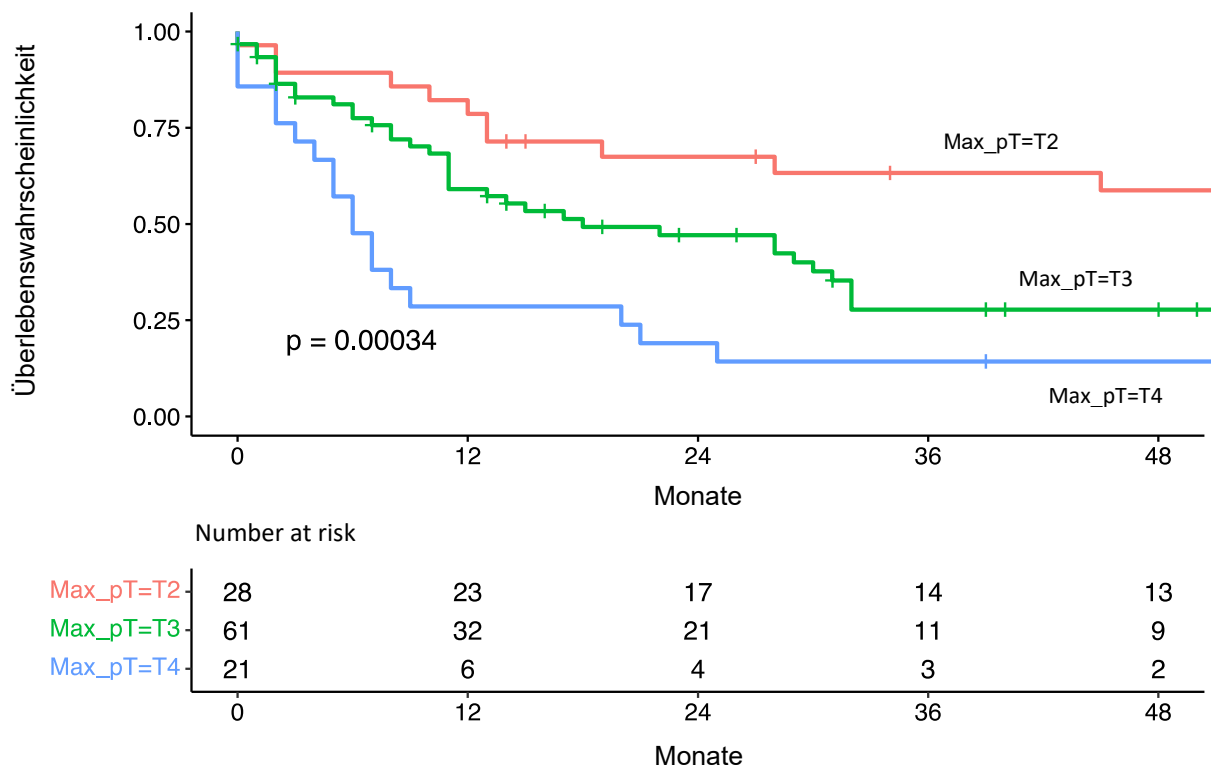


Abbildung 15 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach Tumorstadium

Abbildung 15 zeigt, dass Patienten mit einem Stadium pT2 ein signifikant längeres OS aufwiesen (medianes OS 98 Monate, 95% KI 28-NA) als Patienten mit einem pT3-Stadium (medianes OS 18 Monate, 95% KI 11-32) bzw. solche mit einem pT4-Stadium (medianes OS 6 Monate, 95% KI 4-21; p (logrank) = 0,001).

Max_pT: maximales pathologisches Tumorstadium.

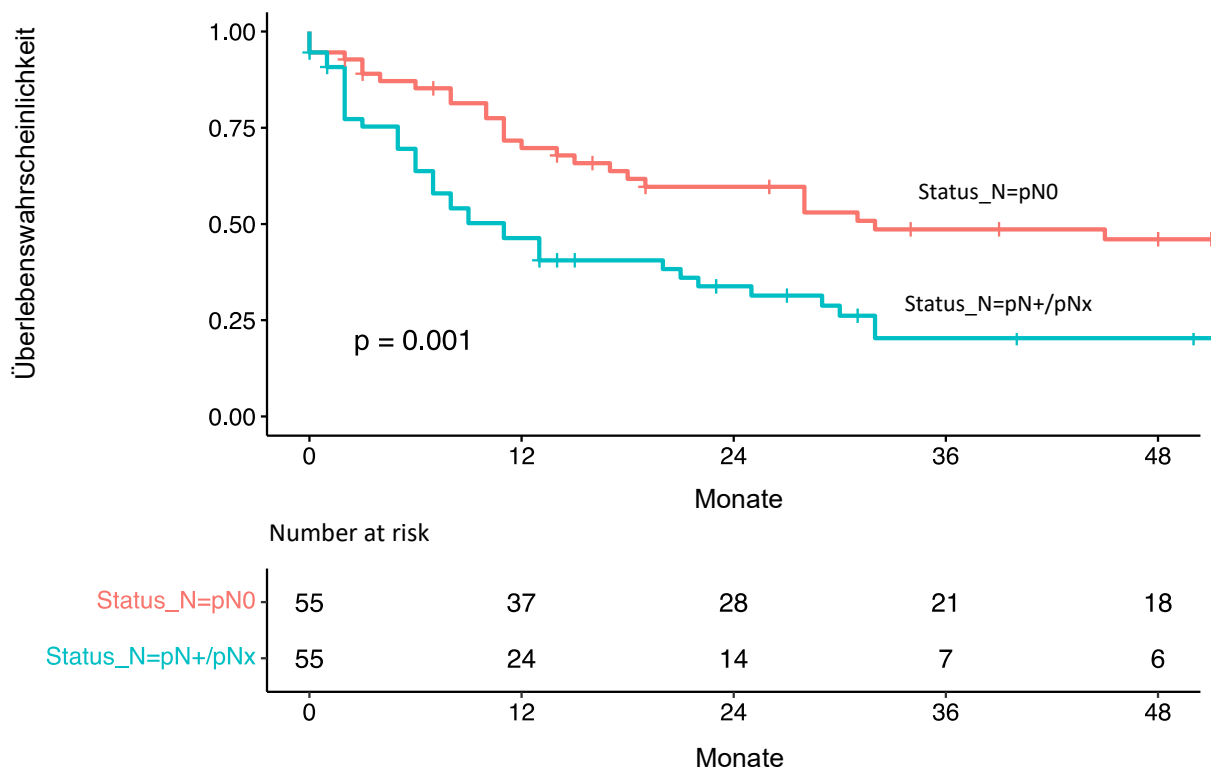


Abbildung 16 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach Lymphknotenstatus

Abbildung 16 zeigt, dass Patienten mit einem negativen Lymphknotenstatus (pN0; medianes OS 32 Monate, 95% KI 18-NA) im Mittel ein signifikant längeres OS als Patienten mit einem pN+/pNx-Status (medianes OS 11 Monate, 95% KI 7-2) zeigten (p (logrank) = 0,001).

Status_N: Lymphknoten-Status, pN: maximaler Lymphknoten-Status, x: nicht beurteilbar.

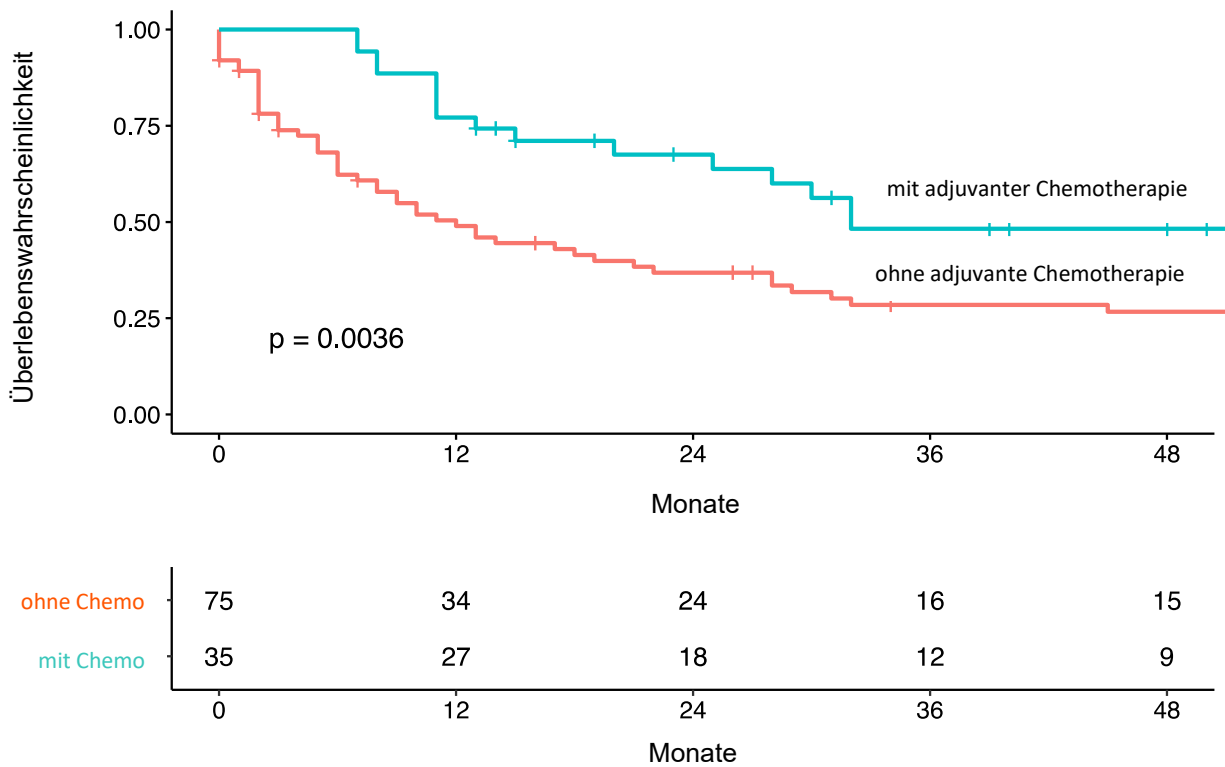


Abbildung 17 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach adjuvanter Chemotherapie

Abbildung 17 zeigt ein längeres OS für Patienten, die mit einer adjuvanten Chemotherapie (medianes OS 32 Monate, 95% KI 25-NA) behandelt wurden als für Patienten, die keine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten (medianes OS 12 Monate, 95% KI 8-28) erhielten (p (logrank) = 0,02).

Ohne Chemo: keine adjuvante Chemotherapie, mit Chemo: mindestens zwei Zyklen einer adjuvanten Chemotherapie.

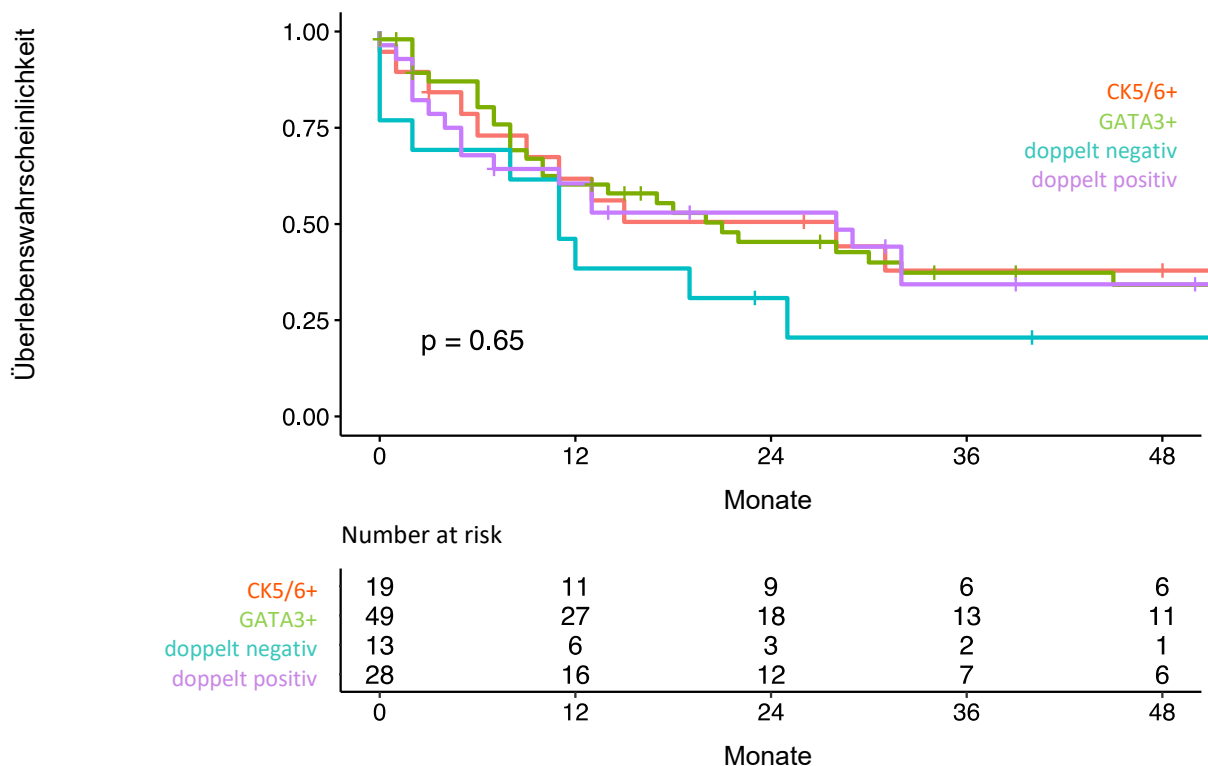


Abbildung 18 Kaplan-Meier-Kurve für das OS, stratifiziert nach IHC-Status.

Abbildung 18 zeigt, dass doppelt negative Fälle mit Abstand das schlechteste OS haben (medianes OS 11 Monate, 95% KI 2-NA). Die Kurven der CK5/6 positiven Fälle (medianes OS 28 Monate, 95% KI 9-NA), der GATA3 positiven Fälle (medianes OS 21 Monate, 95% KI 10-53) und der doppelt positiven Fälle (medianes OS 28 Monate, 95% KI 7-NA) unterschieden sich kaum (p (logrank) = 0,65).

CK5/6+: nur CK5/6 positive Fälle, GATA3+: nur GATA3 positive Fälle, doppelt negativ: CK5/6 und GATA3 negative Fälle, doppelt positiv: CK5/6 und GATA3 positive Fälle.

6.2.3 Uni- und multivariate Überlebensanalysen

In einem letzten Schritt der Auswertung wurden uni- und multivariate Analysen für die verschiedenen Covariaten durchgeführt. Es wurde speziell der Unterschied zwischen OS und krankheitsfreiem Überleben (disease-free survival (DFS)) bei Patienten, die mit und Patienten, die ohne adjuvante Chemotherapie behandelt wurden, untersucht.

Tabelle 20 zeigt ein univariates Cox-Regressionsmodell für den histologischen Subtyp und den IHC-Status, jeweils stratifiziert für Patienten mit und ohne adjuvante Chemotherapie. In der Gruppe aller 110 Zystektomiepatienten sind weder IHC-Marker (CK5/6, GATA3) noch der histologische Subtyp signifikant mit dem OS oder DFS assoziiert. Nach der Stratifizierung für Patienten, die nur eine Zystektomie erhalten hatten, im Vergleich zu Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, zeigte die CK5/6-Positivität einen Trend zu einem längeren Überleben mit adjuvanter Chemotherapie (HR 0,4; 95% KI 0,2-1,2); jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,09$).

In Abbildung 19 ist ein multivariates Cox-Regressionsmodell für das OS unter Berücksichtigung von Tumor und Lymphknoten-Stadium, adjuvanter Chemotherapie und dem IHC-Status dargestellt. Dieses zeigt, dass neben einem höheren Tumor- und Lymphknoten-Stadium die doppelten negativen Fälle mit einem erhöhten Sterberisiko assoziiert waren (HR 4,07; 95% KI 1,518-10,93, $p=0,005$). Auch die adjuvante Chemotherapie war mit einem Überlebensvorteil assoziiert (HR 0,19; 95% KI 0,097-0,36, $p<0,001$).

Abbildung 20 zeigt ein multivariates Cox-Regressionsmodell für das DFS unter Berücksichtigung von Tumor- und Lymphknoten-Stadium, adjuvanter Chemotherapie und dem IHC-Status. Auch hier waren ein höheres Tumor- und Lymphknotenstadium sowie die doppelt negativen Fälle mit einem erhöhten Sterberisiko verbunden (HR 3,62; 95% KI 1,37–9,60, $p=0,01$). Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, zeigten ein verbessertes DFS (HR 0,23; 95% KI 0,12–0,44, $p<0,001$).

Tabelle 20 univariates Cox-Regressionsmodell für histologischen Subtyp und IHC-Status

Tabelle 20 zeigt ein univariates Cox-Regressionsmodell für den histologischen Subtyp und den IHC-Status stratifiziert für Patienten mit und ohne adjuvante Chemotherapie. Es ist zu erkennen, dass in der Gesamtkohorte mit Zystektomie weder IHC-Marker noch der histologische Subtyp signifikant mit dem OS oder DFS assoziiert war. In der Gruppe der Patienten, die eine Zystektomie und eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, zeigte die CK5/6-Positivität einen Trend zu einem verbesserten Überleben (HR 0,4; 95% KI 0,2-1,2). Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht ($p = 0,09$). NOS: nicht weiter spezifiziert, NA: nicht angegeben.

		Gesamtkohorte mit Zystektomie n = 110	p	Zystektomie und adjuvante Chemotherapie	p	nur Zystektomie	p
Histologischer Subtyp	NOS	Referenz		Referenz		Referenz	
	squamös	0,8 (0,3-1,7)	0,5	0,4 (0,06-3,4)	0,6	0,9 (0,4-2,2)	0,9
	mikropapillär	1,2 (0,5-3,1)	0,7	2,9 (0,6-13,1)	0,2	0,89 (0,3-2,9)	0,9
	neuroendokrin	0,9 (0,2-4,1)	0,9	1,8 (0,2-14,1)	0,6	NA	
	andere	0,7 (0,3-1,9)	0,5	0,9 (0,2-4,2)	0,9	0,8 (0,2-3,5)	0,8
CK5/6	positiv	0,9 (0,5-1,4)	0,5	0,4 (0,2-1,2)	0,09	1,1 (0,7-1,9)	0,7
GATA3	positiv	0,8 (0,5-1,3)	0,3	0,7 (0,3-1,8)	0,4	0,8 (0,4-1,4)	0,4
CK5/6 + GATA3	CK5/6 pos	Referenz		Referenz		Referenz	
	GATA3 pos	1,0 (0,5-2,0)	0,9	1,9 (0,4-8,8)	0,4	0,9 (0,4-1,8)	0,7
	doppelt neg	1,6 (0,7-3,7)	0,3	0,3 (0,5-16,7)	0,2	1,7 (0,6-4,7)	0,3
	doppelt pos	1,0 (0,5-2,1)	1,0	1,1 (0,1-5,0)	0,8	1,3 (0,6-2,8)	0,6

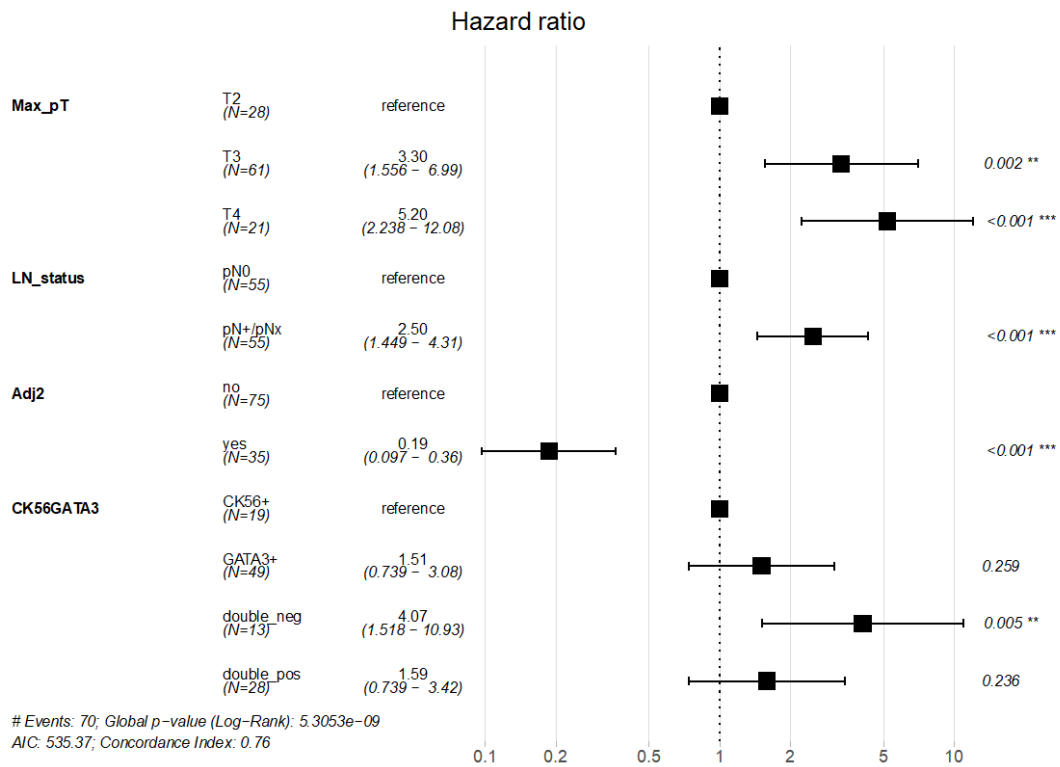


Abbildung 19 Multivariates Cox-Regressionsmodell für das OS

Abbildung 19 zeigt ein multivariates Cox-Regressionsmodell für das Gesamtüberleben (OS) unter Berücksichtigung von Tumor-Stadium und Lymphknoten-Status, adjuvanter Chemotherapie und dem IHC-Status. Es ist zu erkennen, dass ein höheres Tumor- und Lymphknoten-Stadium sowie die doppelt negativen Fälle mit einem erhöhten Sterberisiko einhergingen (HR 4.07; 95% KI 1,518-10,93, p=0,005). Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, hatten einen signifikanten Überlebensvorteil (HR 0,19; 95% KI 0,097-0,36, p<0,001).

Max_pT: maximales pathologisches Tumorstadium, T: Tumorstadium, LN-Status: Lymphknoten-Status, pN: maximaler pathologischer Lymphknoten-Status, Adj2: adjuvante Chemotherapie.

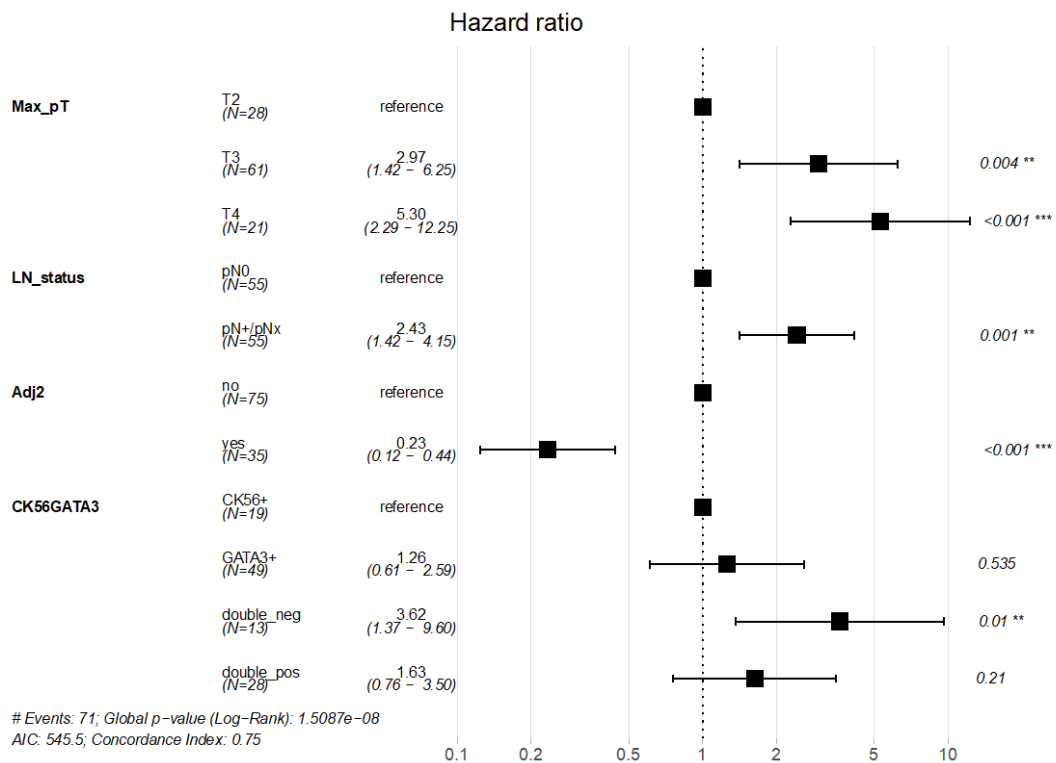


Abbildung 20 Multivariates Cox-Regressionsmodell für das DFS

Abbildung 20 zeigt ein Multivariates Cox-Regressionsmodell für das krankheitsfreie Überleben (DFS) unter Berücksichtigung von Tumor- und LN-Stadium, adjuvanter Chemotherapie und dem IHC-Status. Es ist zu erkennen, dass ein höheres Tumor- und Lymphknotenstadium sowie die doppelt negativen Immunhistochemie mit einem erhöhten Sterberisiko verbunden (HR 3,62; 95% KI 1,37–9,60, $p=0,01$) war. Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, zeigten ein verbessertes DFS (HR 0,23; 95% KI 0,12–0,44, $p<0,001$).

Max_pT: maximales pathologisches Tumorstadium, T: Tumorstadium, LN-Status: Lymphknoten-Status, pN: maximaler pathologischer Lymphknoten-Status, Adj2: adjuvante Chemotherapie.

7 Diskussion

7.1 Ziel der Untersuchung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine repräsentative Kohorte von muskelinvasiven Urothelkarzinomen zusammengestellt und immunhistochemisch systematisch hinsichtlich luminaler und basaler Biomarker untersucht. Die Ergebnisse der morphologischen und immunhistochemischen Auswertung wurden mit dem Überleben (OS, DFS) der Patienten verglichen. Sie zeigen, dass die Expression von CK5/6 mit einer squamösen Differenzierung (96%) assoziiert ist. Die Expression von GATA3 ging dagegen mit einer mikropapillären Differenzierung (100%) einher. In der multivariaten Cox-Regression zeigte die adjuvante Chemotherapie einen deutlichen Überlebensvorteil (HR 0,15 95%KI 0,1-0,3; $p < 0,001$). Patienten, die weder den basalen Marker CK5/6 noch den luminalen Marker GATA3 exprimierten (doppelt negative Gruppe), hatten ein verringertes Gesamtüberleben (HR 4,96; 95%KI 1,6-15,6; $p = 0,006$) und zeigten fünf verschiedene histologische Subtypen. Sie stellen somit eine heterogene Gruppe an Tumoren dar.

7.2 Repräsentativität der Studienkohorte

In Deutschland erhielten im Jahr 2016 7.210 Frauen und 22.270 Männer die Erstdiagnose eines Harnblasenkarzinoms. Somit erkrankten ca. dreimal so viele Männer wie Frauen.¹²³ Von 181 in diese Studie eingeschlossenen Patienten waren 41 Patienten (23%) weiblichen und 140 Patienten (77%) männlichen Geschlechts. Dies zeigt eine deutliche Mehrheit des männlichen Geschlechts in der Studienkohorte und damit eine Vergleichbarkeit zur gesamtdeutschen Bevölkerung. Das Harnblasenkarzinom gilt als Krebs des Alters. Frauen erkrankten im Mittel im Alter von 73,4 Jahren und Männer im Alter von 71,9 Jahren.¹²³ Die Studienkohorte zeigte ein medianes Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation von 70 Jahren. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind Harnblasenkarzinome in ca. 75% der Fälle nicht muskelinvasiv.^{41,124} In unserer Kohorte wurden gemäß Studiendesign nur muskelinvasive Harnblasenkarzinome betrachtet. Bei Betrachtung der Subgruppen war zu erkennen, dass das Durchschnittsalter der Patientengruppe, die mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt worden waren,

deutlich niedriger war als das der Gruppe, die nur eine Zystektomie erhalten hatten. Dies ist dadurch zu erklären, dass Patienten in der Regel eine Chemotherapie nur erhalten können, wenn es der Gesundheitszustand zulässt. Dies ist häufiger bei vorwiegend jüngeren Patienten mit weniger Komorbidität der Fall. Obwohl sich weitere Tumor- und Patientencharakteristika zwischen den Gruppen (Alter, T-, N-Stadium) nicht signifikant voneinander unterschieden, war diese retrospektive Subgruppenanalyse als Limitation für die Überlebensanalyse zu sehen, da Patienten möglicherweise aufgrund ihres ohnehin schon schlechteren Gesundheitszustandes keine Chemotherapie erhalten hatten. Dieser „Selektionsbias“ hat möglicherweise Auswirkungen auf die von uns durchgeführte Lebenszeitanalyse. Zudem wurden weitere Komorbiditäten und die Nierenfunktion nicht berücksichtigt.

Als Stärke der Untersuchung kann die monoinstitutionelle Durchführung gesehen werden. Alle eingeschlossenen Patienten wurden am Universitätsklinikum Frankfurt am Main behandelt. Dadurch konnten Fehler der Datenübertragung vermieden werden. Alle Patienten durchliefen ein weitgehend einheitliches Diagnostik- und Therapieprotokoll und das histologische Material wurde standardisiert untersucht. Zusätzlich wurde das gesamte Material im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der gestellten Diagnose, dem vorliegenden Subtyp und den immunohistochemischen Farbeergebnissen durch zwei unabhängige Uropathologen überprüft. Die IHC wurde standardisiert durchgeführt und bewertet. Alle klinischen Daten wurden durch die Urologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main erhoben und mehrfach kontrolliert. Somit lag eine gut charakterisierte Kohorte von Patienten mit MIBC vor, welche die Voraussetzung für die weiteren Lebenszeitanalysen bildete.

Ein Nachteil der Studie ist, dass es sich um eine retrospektive Analyse von Patientenakten und -material handelt. Außerdem konnten nicht alle Patienten der Gesamtkohorte angemessen nachbeobachtet werden, sodass Überlebensanalysen nur auf eine kleinere Subgruppe bezogen werden konnten. Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, wurden aufgrund der geringen Zahl ebenfalls aus der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Jedoch könnte die Selektion von Patienten für eine neoadjuvante Chemotherapie von höherer klinischer Relevanz sein, da diese insgesamt zu einem signifikanten Überlebensvorteil führt und daher von den Leitlinien für alle Patienten mit MIBC empfohlen wird.^{2,41}

7.3 Bewertung der Untersuchung

Die Auswertung konzentrierte sich in einem ersten Kernschritt auf die Bestimmung der histologischen Subtypen innerhalb der Studienkohorte. Laut Literatur sind mehr als 90% der Blasenkarzinome Urothelkarzinome. Diese neigen zu einer variantenreichen Differenzierung, welche zu einer Vielzahl von histologischen Subtypen führt.¹²⁵⁻¹²⁷ Im Allgemeinen weisen etwa 7 bis 81% der Urothelkarzinome der Blase eine Art von abweichender Differenzierung auf.¹²⁷⁻¹³⁰ In früheren Studien wurde die Häufigkeit der verschiedenen Subtypen in absteigender Reihenfolge folgendermaßen beschrieben: squamöser (31 %), glandulärer (28 %), sarkomatoider (12 %), kleinzelliger (2 %), klarzelliger (2 %), mikrozystischer (2 %), lymphoepitheliomähnlicher (1 %) und undifferenzierter Subtyp (1 %).⁸⁰ In der vorliegenden Arbeit wurden in 29% der Fälle abweichende Differenzierungen diagnostiziert. In Übereinstimmung mit der Literatur war die squamöse Differenzierung die häufigste.^{127,131} Sie machte 13% aller Fälle aus. Die zweithäufigste Variante war in 5% der Fälle die mikropapilläre Differenzierung. Ebenfalls im Einklang mit vorherigen Studien trat der neuroendokrine Subtyp in dieser Studie in 2% der Fälle auf.⁸⁰ Andere ungewöhnliche architektonische Muster (kleinzellig, lymphoepitheliomähnlich, klarzellig, mikrozystisch, undifferenziert) machten nur 9% der Gesamtheit aus. Dies zeigt, dass innerhalb der Studienkohorte, die Subtypen ähnlich wie in bereits veröffentlichten Studien verteilt waren. Es muss jedoch bedacht werden, dass in älteren Arbeiten sowie auch im klinischen Alltag histologische Subtypen ggf. unterrepräsentiert sind, da eine Benennung nicht immer stattfindet oder keine uropathologische Evaluation erfolgt.³

Die zweite Fragestellung der Untersuchung war die Korrelation von histologischen und immunhistochemischen Markern als Ersatz für molekulare Subtypen. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen mit CK5/6, GATA3, CK20, p53 und Synaptophysin als Routineverfahren durchgeführt und die entsprechenden Färbeergebnisse mit den bereits auf den H/E-Schnitten bestimmten histologischen Subtypen verglichen.

Das Tumorsuppressorgen *TP53* spielt in verschiedenen Prozessen innerhalb einer Zelle eine Rolle. Dazu zählen die Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und des Zelltods.¹³² DNA-Bindung an das p53 Protein gilt als Zeichen für invasiv wachsende Tumoren und *TP53*-Mutationen konnten bei 40-60% der Fälle von invasiven

Harnblasenkarzinomen nachgewiesen werden.^{133,134} Die Verwendung von p53-Veränderungen zur Vorhersage von Wiederauftreten, Fortschreiten und Sterblichkeit von Blasenkrebs wurde bereits mehrfach untersucht.^{110,135} Entgegen der Ergebnisse von Malat et al. sowie van Oers et al. zeigte die p53-Färbung in der vorliegenden Studie keine signifikanten Ergebnisse diesbezüglich (siehe Tab. 16); dies mag darauf zurückzuführen sein, dass die immunhistochemische p53 Expression nicht vollständig mit dem *TP53* Mutationsstatus korreliert.¹³⁶

Synaptophysin wird in der Literatur als Marker für neuroendokrine Tumoren beschrieben und wurde zur Identifikation von Harnblasenkarzinomen mit neuroendokriner Differenzierung eingesetzt.¹¹¹ Die Synaptophysin-IHC zeigte sich bei allen vier Fällen mit zumindest partiell neuroendokrinem histologischen Subtyp positiv (siehe Tab. 17). Jedoch wurde in anderen Studien berichtet, dass nicht alle Tumoren mit neuroendokrinen Anteilen durch Synaptophysin angefärbt werden können.¹³⁷ Um neuroendokrine Differenzierungen zuverlässig bestimmen zu können, wird die Anwendung mehrerer neuroendokriner Marker wie z.B. Chromogranin und CD56 empfohlen,^{138,139} was in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt wurde. Da sich insgesamt nur vier Fälle mit partiell neuroendokrinem Subtyp in der Studienkohorte befanden, ist die Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse limitiert. Interessant und von Relevanz war jedoch, dass alle Fälle mit neuroendokrinem Subtyp keine Immunreaktivität für CK5/6, CK20 oder GATA3 aufwiesen.

Blasenkarzinome lassen sich molekular in mindestens zwei Hauptgruppen untergliedern.⁸² Morphologisch präsentieren sich „basale“ Subtypen häufig mit einem squamösen Phänotyp und die Detektion gelingt laut vorheriger Studien mit einer CK5/6-IHC, sodass diese auch in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde.⁸⁴ Zur Detektion „luminaler“ molekularer Subtypen wurden in der Literatur unter anderem CK20 und GATA3 beschrieben, sodass auch immunhistochemische Färbungen mit diesen Markern durchgeführt wurden.^{84,140}

Die Ergebnisse der CK5/6- und GATA3-Färbung repräsentierten in der vorliegenden Studie eine Korrelation von histologischen und molekularen Subtypen und stehen in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten.^{29,141} Denn die CK5/6-Expression war signifikant mit dem weiblichen Geschlecht (26 von 41 weiblichen Fällen, $p=0,004$) und dem histologisch squamösen Subtyp (25 von 26 squamösen Fällen, $p<0,001$)

assoziiert, während alle als histologisch mikropapillär eingestuftten Fälle eine negative CK5/6-IHC zeigten (siehe Tab. 13 und Abb. 11). Und auch die GATA3-Expression war signifikant mit den histologisch mikropapillären Fällen (9 von 9 mikropapillären Fällen, $p < 0,001$) assoziiert (siehe Tab. 15 und Abb. 12). Diese Assoziation des mikropapillären histologischen Subtyps mit luminaler Gen- und Proteinexpression wurde bereits mehrfach in Studien beschrieben.^{29,141} Im Gegensatz dazu lieferte die CK20-IHC in unserer Studie keine signifikanten Ergebnisse im Hinblick auf Geschlecht, Tumorstadium oder dem prädominanten histologischen Subtyp (siehe Tab. 14). Es war sowohl die Mehrheit der squamösen Fälle (24 von 26 Fällen) als auch die Mehrheit der mikropapillären Fälle (7 von 9 Fällen) für CK20 negativ. Obwohl CK20 als luminaler Marker beschrieben ist, wiesen deutlich weniger Fälle eine klare Reaktivität auf als für GATA3.⁹³ Aufgrund der signifikanten Verteilungen des Markers GATA3, wurde dieser von uns sowie auch schon zuvor in der Literatur beschrieben, als Surrogatmarker verwendet.¹⁴¹ In anderen Studien wurde die Kombination mehrerer Marker zur Verbesserung der immunhistochemischen Klassifikation des MIBC empfohlen.¹⁴¹⁻¹⁴³

Um jeweils einen Marker für basale und lumbale Subtypen zu verwenden und dadurch eine bessere Vergleichbarkeit mit der Literatur zu schaffen, konzentrierte sich die Auswertung daraufhin nur auf die Färbeergergebnisse der beiden immunhistochemischen Marker CK5/6 und GATA3. Choi et al. berichteten von einer Korrelation zwischen mRNA-Expressionsprofilen und IHC-Färbeergergebnissen in luminalen (CK20-Expression) und basalen (CK5/6-Expression) Subtypen.⁸⁴ Guo et al. konnten in Ihrer Studie in 80-90% der Fälle lumbale und basale Subtypen mit Hilfe der CK5/6 und GATA3-IHC identifizieren. Daraus wurde gefolgert, dass diese beiden IHC-Marker ein nützliches Werkzeug bei routinemäßigen pathologischen Befundungen sein könnten, um die grundlegenden molekularen Subtypen von Blasenkrebs zu identifizieren.¹⁴⁰ Um dies zu überprüfen und möglicherweise einen weiteren Beweis dafür zu liefern, wurden alle 181 in die Studie eingeschlossenen Fälle genauer in Bezug auf die Färbeergergebnisse der CK5/6 und GATA3 IHC analysiert und in vier Gruppen unterteilt (1. CK5/6 positiv, GATA negativ; 2. CK5/6 positiv, GATA3 negativ; 3. CK5/6 positiv, GATA3 positiv; 4. CK5/6 negativ, GATA3 negativ). Insbesondere die Gruppe der doppelt negativen Fälle stellte sich in dieser Arbeit sehr heterogen dar. Es konnten folgende histologische Subtypen ausgemacht

werden: Neun Fälle vom NOS-Subtyp (53%), vier Fälle vom neuroendokrinen Subtyp (24%) und vier andere Subtypen (24%; sarkomatoid, lymphoepithelial, klarzellig, undifferenziert/riesenzellig) waren doppelt negativ (siehe Tab. 18 und Abb. 14). Auffällig war dabei, dass alle vier histologisch neuroendokrinen Fälle der Studienkohorte in den IHC-Analysen doppelt negativ waren. Dies ist interessant, da eine neuroendokrine Differenzierung eine sehr aggressive Variante des Blasenkarzinoms mit schlechter Prognose darstellt.^{28,144} Diese Tumoren sollten daher mit einer vorgeschalteten Chemotherapie behandelt werden und sprechen möglicherweise auf eine Immun-Checkpoint-Inhibition an.^{2,145} Insgesamt zeigte die vorliegende Studie somit eine hohe Übereinstimmung von histologisch und immunhistochemisch mit CK5/6 und GATA3 bestimmten Subtypen des Blasenkarzinoms. Die Verwendung der weiteren untersuchten Marker/Kombination mit CK20, p53 und Synaptophysin wurde in dieser Arbeit in Bezug auf eine „Vereinfachung“ der molekularen Subtypen nicht weiter untersucht. Dennoch spielen die Marker in der pathologischen Routine eine wichtige Rolle, um z.B. neuroendokrine Karzinome oder den *TP53*-Mutationsstatus zu diagnostizieren.

Um Aussagen über das Überleben der Patienten spezifiziert nach vorliegendem Subtyp sowie Behandlung mit und ohne Chemotherapie machen zu können, wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt. In die Subgruppenanalyse wurden nur Fälle eingeschlossen, die eine Zystektomie in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main erhalten hatten und für die angemessene Nachbeobachtungsdaten vorlagen. Um eine homogene Kohorte zu generieren wurden Patienten, die primär metastasiert waren (cM+) ausgeschlossen, da diese im Vergleich zu lokal begrenzten Tumoren eine deutlich schlechtere Prognose haben.⁴¹ Aufgrund der geringen Zahlen an Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, wurden diese nicht in die Überlebensanalyse miteinbezogen. Da laut Leitlinien die neoadjuvante Chemotherapie bei allen Patienten mit MIBC durchgeführt werden sollte, wäre insbesondere für diese Indikation eine Selektion wichtig.^{2,41}

Innerhalb der Subgruppe wurden 110 Fälle analysiert (siehe Tab. 19). Davon hatten 75 Patienten „nur“ eine Zystektomie und 35 Patienten zusätzlich zur Zystektomie mindestens zwei Zyklen adjuvanter Chemotherapie erhalten. An Kaplan-Meier-

Überlebenskurven wurde der Einfluss des Tumor- und Lymphknotenstadiums, der adjuvanten Chemotherapie und des IHC-Status auf das Gesamtüberleben untersucht. Wie erwartet und aus der Literatur bekannt, zeigte sich, dass das Tumor- und insbesondere das Lymphknotenstadium die wichtigsten Prognosefaktoren für das Überleben nach radikaler Zystektomie sind (Abb. 15, 16).¹⁴⁶ Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, hatten einen klaren Überlebensvorteil, was im Einklang mit veröffentlichten Daten war.^{147,148} Dabei ist jedoch die bereits genannte Selektionsverzerrung zu beachten, da Patienten, die eine Chemotherapie erhalten hatten, jünger waren und Nierenfunktionseinschränkungen oder Komorbiditäten nicht berücksichtigt worden waren.

In einem univariaten Cox-Regressionsmodell für den histologischen Subtyp und den IHC-Status stratifiziert für Patienten mit und ohne adjuvante Chemotherapie waren in der Gruppe aller 110 Zystektomiepatienten weder IHC-Marker (CK5/6, GATA3) noch der histologische Subtyp signifikant mit OS oder DFS assoziiert (siehe Tab. 20). Nach der Stratifizierung für Patienten, die nur eine Zystektomie erhalten hatten, im Vergleich zu Patienten mit adjuvanter Chemotherapie, zeigte die CK5/6-Positivität einen Trend zu einem verbesserten Überleben mit adjuvanter Chemotherapie (Hazard Ratio 0,42; 95% Konfidenzintervall 0,2-1,2). Jedoch wurde hier das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p = 0,09$). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den verfügbaren Daten für eine neoadjuvante Chemotherapie, die darauf hindeuten, dass Patienten mit molekular „basalen“ Tumortypen eine schlechtere Prognose, aber ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie haben, während „luminale“ Tumoren insgesamt eine bessere Prognose haben und weniger von einer zusätzlichen Chemotherapie profitieren.^{90,149-150} Neuere Daten kommen jedoch teilweise zu widersprüchlichen Ergebnisse, sodass die molekularen Subtypen als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Chemotherapie noch nicht abschließend bewertet werden können und weitere Validierungen ausstehen.^{144,151-152}

In einem letzten Schritt der Auswertung wurde eine multivariate Analyse für das OS unter Berücksichtigung von Tumor- und Lymphknoten-Stadium, adjuvanter Chemotherapie und dem IHC-Status durchgeführt (siehe Abb. 19). Die multivariate Analyse zeigte, dass die adjuvante Chemotherapie mit einem Überlebensvorteil assoziiert war (HR 0,15; Konfidenzintervall 95% 0,07-0,3, $p < 0,001$). Außerdem war

auffällig, dass neben dem Tumor- und Lymphknoten-Stadium die doppelt negativen Fälle mit einem erhöhten Sterberisiko verbunden waren (HR 4,07; 95% KI 1,518-10,93, $p=0,005$). Dies wurde bereits in anderen Studien festgestellt.^{141,153} Es wurden jedoch keine detaillierten molekularen Analysen berichtet, da keine vollständigen transkriptomischen Analysen durchgeführt worden waren.^{140,141} Um dies weiter zu verfolgen, wurden in einer bereits publizierten Arbeit unter dem Titel „CK5/6 and GATA3 Defined Phenotypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer: Impact in Adjuvant Chemotherapy and Molecular Subtyping of Negative Cases“ molekulare Analysen der doppelten negativen Gruppe unter Verwendung eines mRNA-Transkriptom-Panels durchgeführt und molekulare Subtypen der Konsensklasse bestimmt.¹²² Wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichten diese Untersuchung.

7.4 Abschließender Ausblick

Bislang bleibt das histopathologische Staging der wichtigste prognostische Faktor und es gibt keine auf Biomarkern basierenden Auswahlkriterien für Patienten mit Harnblasenkarzinom, die für eine Chemotherapie geeignet sind.¹⁵⁴ Es wäre jedoch von Vorteil, wenn in Zukunft vor Beginn einer adjuvanten Therapie festgestellt werden könnte, ob ein Patient auf diese auch ansprechen würde. Dadurch könnte Patienten, welche aufgrund des vorliegenden Subtyps von Grund auf nicht auf eine Chemotherapie ansprechen, die Toxizitäten einer solchen Behandlung erspart bleiben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass histologische Subtypen und die immunhistochemische Klassifizierung des MIBCs miteinander assoziiert sind. IHC-Färbungen können im klinischen Alltag für eine Unterteilung in „luminale“ und „basale“ Subtypen zu Hilfe genommen werden. Allerdings scheinen zwei Klassen (luminal und basal) nicht ausreichend zu sein, um der Heterogenität und den verschiedenen Subtypen gerecht zu werden. Zudem unterscheiden sich die Marker GATA3 und CK5/6 zwar in zwei bzw. vier Klassen, aber eine genauere Subklassifizierung kann nur mit größeren Markerpanels erreicht werden.^{143,155} Sjødahl konnte zeigen, dass für die Klassifikation von nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinomen zwei Marker ausreichend sind, für die korrekte Klassifikation von muskelinvasiven Blasenkarzinomen jedoch aufgrund der zwei zusätzlichen Phänotypen mesenchymähnlicher sowie kleinzelliger bzw.

neuroendokrinen Tumoren insgesamt 13 Marker nötig sind.¹⁴³ Bernardo et al. kamen zu dem Ergebnis, dass sogar eine IHC von bis zu 15 Proteinen verwendet werden sollte.¹⁵⁵ In beiden Studien werden unter anderem für die eindeutige Detektion des kleinzellig/neuroendokrinen Phänotyps bereits mehrere Marker benötigt; dies betont die besondere Stellung dieser seltenen Tumorentität. Sie sind in der vorliegenden Arbeit eindeutig als eine Untergruppe der doppelt negativen Fälle vertreten. Diese Gruppe zeichnete eine große Heterogenität sowie eine schlechte Prognose aus, welche eine individualisierte Therapie erfordert. Die Vielzahl der vorliegenden molekularen Klassifizierungssysteme, die sich durch technische und methodische Unterschiede auszeichnen, wurde mittels der Konsensusklassifikation in Einklang gebracht, jedoch hat bisher noch keine weiterführende, prospektive Validierung stattgefunden.²⁹ Somit haben die Transkriptomanalysen zur molekularen Subklassifizierung zwar geholfen die Biologie des Blasenkarzinoms zu verstehen, aber Daten, um sie für Therapieentscheidungen heranzuziehen sind noch nicht ausreichend vorhanden. In der Zukunft wird es von Bedeutung sein, die Bestimmung der Konsensusklassen anhand von Gen- und/oder Proteinpanels (bei denen CK5/6 und GATA3 wahrscheinlich Bestandteil sein werden) für den klinischen Gebrauch zu vereinfachen und den prädiktiven Wert prospektiv zu validieren.

8 Zusammenfassung Deutsch

Das Harnblasenkarzinom ist einer der häufigsten Tumoren weltweit.¹ Insbesondere die muskelinvasiven Tumoren haben eine schlechte Prognose und stellen sich morphologisch sehr unterschiedlich dar.² Diese Heterogenität wird bislang bei Therapieentscheidungen nicht beachtet. Um Patienten zukünftig individuell auf den vorliegenden Subtyp des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms (MIBC, muscle invasive bladder cancer) behandeln zu können und dadurch unnötige Belastungen durch Chemotherapien vermeiden zu können, ist eine einfache und kostengünstige Diagnostik erforderlich.^{2,3} Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einsatz bestimmter immunhistochemischer Färbungen als ein mögliches diagnostisches Routineverfahren zur Bestimmung der vorliegenden Subtypen auszutesten. Hierzu wurde die Expression von „luminalen“ und „basalen“ Proteinen mit histologischen Subtypen des MIBCs korreliert. In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss auf das Überleben mit und ohne adjuvante Chemotherapie untersucht.

Es wurden insgesamt 181 Tissue-Microarray-Spots analysiert. Alle histologischen Patientenproben sowie klinischen Daten stammten aus dem Universitätsklinikum Frankfurt am Main. Aus den entsprechenden Gewebeblöcken wurden Stenzen zur Erstellung eines Tissue-Microarrays (TMAs) entnommen. Diese wurden konventionell angeschnitten und histologisch mit Hämatoxylin-Eosin (H/E) sowie immunhistochemisch mit Cytokeratin 5/6 (CK5/6), Cytokeratin 20 (CK20), Glutaryl Aminotransferase-Untereinheit A bindendem Protein 3 (GATA3), Tumorsuppressorprotein p53 und Synaptophysin (SYNAPT) gefärbt.

Anhand der H/E-Schnitte wurden die vorliegenden histologischen Subtypen lichtmikroskopisch bestimmt und es folgte eine statistische Auswertung der Färbeergebnisse. Die deskriptive statistische Analyse zeigte insbesondere für die beiden Färbungen CK5/6 und GATA3 signifikante Ergebnisse. Deshalb wurden in einem zweiten Schritt alle Fälle der Studienkohorte den bekannten vier Gruppen: CK5/6 positiv, GATA3 positiv, doppelt positiv und doppelt negativ zugeordnet und näher untersucht. Es folgte eine Überlebensanalyse nach Kaplan Meier Schätzer sowie uni- und multivariate Analysen.

Die Ergebnisse zeigten eine Assoziation der Expression von CK5/6 mit einer squamösen Differenzierung (96%) und eine Assoziation der Expression von GATA3 mit einer mikropapillären Differenzierung (100%). Die adjuvante Chemotherapie ging mit einem Überlebensvorteil (HR 0,15 95%KI 0,1-0,3; $p < 0,001$) der Patienten mit MIBC einher. Immunhistochemisch doppelt negative Patienten mit MIBC wiesen ein verringertes Gesamtüberleben auf (HR 4,96; 95%KI 1,6-15,6; $p = 0,006$); in der Gruppe der doppelt negativen MIBCs fanden sich fünf verschiedene histologische Subtypen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die immunhistochemische Klassifizierung des MIBCs mit histologischen Subtypen assoziiert ist und dabei helfen kann, Fälle in der pathologischen Routine in „luminal“ und „basal“ zu unterteilen. Jedoch ist ein auf zwei Markern basierendes Klassifizierungssystem nicht ausreichend, um die Heterogenität des MIBCs abzubilden und die Basis für Therapieentscheidungen zu bilden.

9 Zusammenfassung Englisch

Bladder cancer is one of the most common tumors worldwide.¹ Especially muscle-invasive tumors have a poor prognosis and exhibit significant morphological heterogeneity.² However, this heterogeneity is not currently presented in treatment decisions. To be able to treat patients with muscle-invasive bladder cancer (MIBC) based on the specific subtype and avoid unnecessary burdens from chemotherapy, a simple and cost-effective diagnostic method is required.^{2,3} The aim of this study was to test the use of specific immunohistochemical stains as a possible routine diagnostic procedure for determining the subtypes of MIBC. The expression of "luminal" and "basal" proteins was correlated with histological subtypes of MIBC. In a second step, the impact on survival with and without adjuvant chemotherapy was examined.

A total of 181 tissue microarray spots were analyzed. All histological patient samples and clinical data obtained from the University Hospital Frankfurt am Main. Punches were taken from the corresponding tissue blocks to create a tissue microarray (TMA). These were conventionally sectioned and stained histologically with hematoxylin-eosin (H/E) and immunohistochemically with cytokeratin 5/6 (CK5/6), cytokeratin 20 (CK20), glutamyl aminotransferase subunit A binding protein 3 (GATA3), tumor suppressor protein p53 and synaptophysin (SYNAPT).

Based on the H/E sections, the histological subtypes were determined by light microscopy, followed by statistical evaluation of the staining results. The descriptive statistical analysis showed significant results, particularly for the CK5/6 and GATA3 stains. Therefore, in a second step, all cases in the study cohort were assigned to the four known groups: CK5/6 positive, GATA3 positive, double positive and double negative, and further investigated. A survival analysis was performed using the Kaplan-Meier estimator as well as uni- and multivariate analyses. The results showed an association between CK5/6 expression and squamous differentiation (96%) and an association between GATA3 expression and micropapillary differentiation (100%). Adjuvant chemotherapy was associated with a survival advantage (HR 0.15, 95% CI 0.1-0.3; $p < 0.001$) in patients with MIBC. Immunohistochemically double-negative patients with MIBC had reduced overall survival (HR 4.96, 95% CI 1.6-15.6; $p = 0.006$); within the

double-negative MIBCs, five different histological subtypes were identified. In conclusion, immunohistochemical classification of MIBC is associated with histological subtypes and can help divide cases into "luminal" and "basal" categories in routine pathology. However, a classification system based on two markers is not sufficient to capture the heterogeneity of MIBC and serve as the basis for treatment decisions.

10 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
2. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol.* 2021;79(1):82-104. doi:10.1016/j.eururo.2020.03.055
3. Fernández MI, Martini T, Schultz M. Urothelkarzinom der Harnblase: Klassifikation. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth MP, eds. *Die Urologie. Springer Reference Medizin.* Springer Berlin Heidelberg; 2022:1-8. doi:10.1007/978-3-642-41168-7_106-2
4. Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft. Blasenkrebs: Häufigkeit, Risikofaktoren, Symptome. (27.12.2021). Accessed May 15, 2022. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/harnblasenkrebs/was-ist-harnblasenkrebs.php>
5. Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* 2001;10(1):7-14. doi:10.1097/00008469-200102000-00002
6. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011;306(7):737-745. doi:10.1001/jama.2011.1142
7. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer.* 2000;86(2):289-294. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(20000415)86:2<textless289::AID-IJC21<textgreater3.0.CO;2-M
8. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Vol v. 83. IARC Press; 2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316407/>

9. Dietrich H, Dietrich B. Ludwig Rehn (1849-1930)—pioneering findings on the aetiology of bladder tumours. *World J Urol.* 2001;19(2):151-153. doi:10.1007/s003450100211
10. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl.* 1987;7:1-440.
11. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract.* 2002;10(6):311-322. doi:10.1046/j.1523-5394.2002.106011.x
12. Cogliano VJ, Baan R, Straif K, et al. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(24):1827-1839. doi:10.1093/jnci/djr483
13. Vlaanderen J, Straif K, Ruder A, et al. Tetrachloroethylene exposure and bladder cancer risk: a meta-analysis of dry-cleaning-worker studies. *Environ Health Perspect.* 2014;122(7):661-666. doi:10.1289/ehp.1307055
14. Eble JN. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs: ... Editorial and Consensus Conference in Lyon, France, December 14 - 18, 2002. Vol 6. Reprint. IARC Press; 2006. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb7/index.php>
15. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2006;3(6):327-340. doi:10.1038/ncpuro0510
16. Yu Z, Yue W, Jiuzhi L, Youtao J, Guofei Z, Wenbin G. The risk of bladder cancer in patients with urinary calculi: a meta-analysis. *Urolithiasis.* 2018;46(6):573-579. doi:10.1007/s00240-017-1033-7
17. Martin C, Leiser CL, O'Neil B, et al. Familial Cancer Clustering in Urothelial Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2018;110(5):527-533. doi:10.1093/jnci/djx237
18. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1):25-41. doi:10.1038/nrc3817

19. Amin MB. Histological variants of urothelial carcinoma: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Mod Pathol*. 2009;22(2):S96-S118. doi:10.1038/modpathol.2009.26
20. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, et al. Bladder cancer. *The Lancet*. 2016;388(10061):2796-2810. doi:10.1016/S0140-6736(16)30512-8
21. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, eds. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. International agency for research on cancer; 2016.
22. Babjuk M, Burger M, Capoun O, et al. European Association of Urology Guidelines on Non–muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol*. 2022;81(1):75-94. doi:10.1016/j.eururo.2021.08.010
23. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. TNM Classification of Malignant Tumours. Eighth edition. John Wiley & Sons, Inc; 2017.
24. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, et al. Grading the Invasive Component of Urothelial Carcinoma of the Bladder and Its Relationship With Progression-Free Survival: *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):980-987. doi:10.1097/00000478-200007000-00009
25. Veskimäe E, Espinos EL, Bruins HM, et al. What Is the Prognostic and Clinical Importance of Urothelial and Nonurothelial Histological Variants of Bladder Cancer in Predicting Oncological Outcomes in Patients with Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer? A European Association of Urology Muscle Invasive and Metastatic Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol Oncol*. 2019;2(6):625-642. doi:10.1016/j.euo.2019.09.003
26. Sjödaahl G, Lauss M, Lövgren K, et al. A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3377-3386. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T
27. Choi W, Porten S, Kim S, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014;25(2):152-165. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.009

28. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017;171(3):540-556.e25. doi:10.1016/j.cell.2017.09.007
29. Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, et al. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2020;77(4):420-433. doi:10.1016/j.eururo.2019.09.006
30. Messing EM, Vaillancourt A. Hematuria Screening for Bladder Cancer: *J Occup Environ Med*. 1990;32(9):838-845. doi:10.1097/00043764-199009000-00016
31. Varkarakis MJ, Gaeta J, Moore RH, Murphy GP. Superficial bladder tumor. *Urology*. 1974;4(4):414-420. doi:10.1016/0090-4295(74)90010-7
32. Halebian GE, Skinner EC, Dickinson MG, Lieskovsky G, Boyd SD, Skinner DG. HYDRONEPHROSIS AS A PROGNOSTIC INDICATOR IN BLADDER CANCER PATIENTS: *J Urol*. Published online December 1998:2011-2014. doi:10.1097/00005392-199812010-00018
33. Alfred Witjes J, Le Bret T, Compérat EM, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2017;71(3):462-475. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.020
34. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*. 2005;66(6):35-63. doi:10.1016/j.urology.2005.08.064
35. Raitanen MP, Aine R, Rintala E, et al. Differences Between Local and Review Urinary Cytology in Diagnosis of Bladder Cancer. An Interobserver Multicenter Analysis. *Eur Urol*. 2002;41(3):284-289. doi:10.1016/S0302-2838(02)00006-4
36. vom Dorp F, Pal P, Tschirdewahn S, et al. Correlation of Pathological and Cytological-Cytometric Grading of Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Tract. *Urol Int*. 2011;86(1):36-40. doi:10.1159/000321017
37. Albers P, Heidenreich A, eds. *Standardoperationen in der Urologie*. 2nd ed. Georg Thieme Verlag; 2014:b-002-95261. doi:10.1055/b-002-95261

38. Rosenblatt R, Sherif A, Rintala E, et al. Pathologic Downstaging Is a Surrogate Marker for Efficacy and Increased Survival Following Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Cystectomy for Muscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2012;61(6):1229-1238. doi:10.1016/j.eururo.2011.12.010
39. Voskuilen CS, Oo HZ, Genitsch V, et al. Multicenter Validation of Histopathologic Tumor Regression Grade After Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2019;43(12):1600-1610. doi:10.1097/PAS.0000000000001371
40. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. UPDATE ON CHEMOTHERAPY FOR ADVANCED BLADDER CANCER. *J Urol.* 2005;174(1):14-20. doi:10.1097/01.ju.0000162039.38023.5f
41. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.1, 2016, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html> , (Stand: 15.04.2022).
42. Vale CL. Neoadjuvant Chemotherapy in Invasive Bladder Cancer: Update of a Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Patient Data. *Eur Urol.* 2005;48(2):202-206. doi:10.1016/j.eururo.2005.04.006
43. Kitamura H, Tsukamoto T, Shibata T, et al. Randomised phase III study of neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, doxorubicin, vinblastine and cisplatin followed by radical cystectomy compared with radical cystectomy alone for muscle-invasive bladder cancer: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0209. *Ann Oncol.* 2014;25(6):1192-1198. doi:10.1093/annonc/mdu126
44. Schmid SC, Gschwend JE, Retz M. Medikamentöse Therapie des fortgeschrittenen Blasenkarzinoms: Neue Entwicklungen 2014. *Urol.* 2014;53(10):1535-1542. doi:10.1007/s00120-014-3641-y
45. Maisch P, Lunger L, Düwel C, et al. Outcomes of palliative cystectomy in patients with locally advanced pT4 bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2021;39(6):368.e11-368.e17. doi:10.1016/j.urolonc.2020.11.042

46. Grunewald CM, Hiester A, Niegisch G. Systemtherapie beim metastasierten Urothelkarzinom – Aktueller Stand und was kommt nach den Checkpointinhibitoren? Aktuelle Urol. 2020;51(04):371-376. doi:10.1055/a-1136-9850
47. Resch I, Shariat S, Gust K. Immun-Checkpoint-Inhibitoren in der Therapie des Harnblasenkarzinoms. Published online January 1, 2017.
48. Lopez-Beltran A, Cimadamore A, Blanca A, et al. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Bladder Cancer. Cancers. 2021;13(1):131. doi:10.3390/cancers13010131
49. Charlton ME, Adamo MP, Sun L, Deorah S. Bladder cancer collaborative stage variables and their data quality, usage, and clinical implications: a review of SEER data, 2004-2010. Cancer. 2014;120 Suppl 23(0 23):3815-3825. doi:10.1002/cncr.29047
50. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. Eur Urol. 2013;63(2):234-241. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033
51. Karakiewicz PI, Shariat SF, Palapattu GS, et al. Nomogram for predicting disease recurrence after radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol. 2006;176(4 Pt 1):1354-1361; discussion 1361-2. doi:10.1016/j.juro.2006.06.025
52. Bochner BH, Kattan MW, Vora KC. Postoperative nomogram predicting risk of recurrence after radical cystectomy for bladder cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2006;24(24):3967-3972. doi:10.1200/JCO.2005.05.3884
53. Donat SM. Staged based directed surveillance of invasive bladder cancer following radical cystectomy: valuable and effective? World J Urol. 2006;24(5):557-564. doi:10.1007/s00345-006-0117-8
54. Hassan JM, Cookson MS, Smith JA, Chang SS. Patterns of Initial Transitional Cell Recurrence in Patients After Cystectomy. J Urol. 2006;175(6):2054-2057. doi:10.1016/S0022-5347(06)00323-5
55. Yoo SH, Kim H, Kwak C, Kim HH, Jung JH, Ku JH. Late Recurrence of Bladder Cancer following Radical Cystectomy: Characteristics and Outcomes. Urol Int. 2019;103(3):291-296. doi:10.1159/000502656

56. Hautmann RE, Gschwend JE, de Petriconi RC, Kron M, Volkmer BG. Cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: results of a surgery only series in the neobladder era. *J Urol.* 2006;176(2):486-492; discussion 491-2. doi:10.1016/j.juro.2006.03.038
57. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results in 1,054 Patients. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):666-675. doi:10.1200/JCO.2001.19.3.666
58. Chang SS, Bochner BH, Chou R, et al. Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline. *J Urol.* 2017;198(3):552-559. doi:10.1016/j.juro.2017.04.086
59. Sangoi AR, Beck AH, Amin MB, et al. Interobserver reproducibility in the diagnosis of invasive micropapillary carcinoma of the urinary tract among urologic pathologists. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(9):1367-1376. doi:10.1097/PAS.0b013e3181ec86b3
60. Hansel DE, Amin MB, Comperat E, et al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol.* 2013;63(2):321-332. doi:10.1016/j.eururo.2012.10.008
61. Linder BJ, Boorjian SA, Cheville JC, et al. The impact of histological reclassification during pathology re-review—evidence of a Will Rogers effect in bladder cancer? *J Urol.* 2013;190(5):1692-1696. doi:10.1016/j.juro.2013.05.040
62. Kim SP, Frank I, Cheville JC, et al. The impact of squamous and glandular differentiation on survival after radical cystectomy for urothelial carcinoma. *J Urol.* 2012;188(2):405-409. doi:10.1016/j.juro.2012.04.020
63. Linder BJ, Frank I, Cheville JC, et al. Outcomes following radical cystectomy for nested variant of urothelial carcinoma: a matched cohort analysis. *J Urol.* 2013;189(5):1670-1675. doi:10.1016/j.juro.2012.11.006
64. Wang JK, Boorjian SA, Cheville JC, et al. Outcomes following radical cystectomy for micropapillary bladder cancer versus pure urothelial carcinoma: a matched cohort analysis. *World J Urol.* 2012;30(6):801-806. doi:10.1007/s00345-012-0976-0

65. Bertz S, Hartmann A, Knüchel-Clarke R, Gaisa NT. Spezifische Typen des Harnblasenkarzinoms. *Pathol.* 2016;37(1):40-51. doi:10.1007/s00292-015-0129-5
66. Huang W, Williamson SR, Rao Q, et al. Novel markers of squamous differentiation in the urinary bladder. *Hum Pathol.* 2013;44(10):1989-1997. doi:10.1016/j.humpath.2013.04.005
67. Lopezbeltran A, Cheng L. Histologic variants of urothelial carcinoma: differential diagnosis and clinical implications. *Hum Pathol.* 2006;37(11):1371-1388. doi:10.1016/j.humpath.2006.05.009
68. Wang J, Wang FW, LaGrange CA, Hemstreet III GP, Kessinger A. Clinical Features of Sarcomatoid Carcinoma (Carcinosarcoma) of the Urinary Bladder: Analysis of 221 Cases. *Sarcoma.* 2010;2010:1-7. doi:10.1155/2010/454792
69. Beltran AL, Cheng L, Montironi R, et al. Clinicopathological characteristics and outcome of nested carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch.* 2014;465(2):199-205. doi:10.1007/s00428-014-1601-y
70. Wasco MJ, Daignault S, Bradley D, Shah RB. Nested variant of urothelial carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 30 pure and mixed cases. *Hum Pathol.* 2010;41(2):163-171. doi:10.1016/j.humpath.2009.07.015
71. McQuitty E, Ro JY, Truong LD, Shen SS, Zhai Q, Ayala AG. Lymphovascular Invasion in Micropapillary Urothelial Carcinoma: A Study of 22 Cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(6):635-639. doi:10.5858/arpa.2011-0463-OA
72. Kamat AM, Dinney CPN, Gee JR, et al. Micropapillary bladder cancer: A review of the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center experience with 100 consecutive patients. *Cancer.* 2007;110(1):62-67. doi:10.1002/cncr.22756
73. Kamat AM, Gee JR, Dinney CPN, et al. The Case for Early Cystectomy in the Treatment of Nonmuscle Invasive Micropapillary Bladder Carcinoma. *J Urol.* 2006;175(3):881-885. doi:10.1016/S0022-5347(05)00423-4

74. Ro JY, Shen SS, Lee HI, et al. Plasmacytoid Transitional Cell Carcinoma of Urinary Bladder: A Clinicopathologic Study of 9 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(5):752-757. doi:10.1097/PAS.0b013e318159af9e
75. Dayyani F, Czerniak BA, Sircar K, et al. Plasmacytoid Urothelial Carcinoma, a Chemosensitive Cancer with Poor Prognosis, and Peritoneal Carcinomatosis. *J Urol*. 2013;189(5):1656-1661. doi:10.1016/j.juro.2012.11.084
76. Ricardo-Gonzalez RR, Nguyen M, Gokden N, Sangoi AR, Presti JC, McKenney JK. Plasmacytoid Carcinoma of the Bladder: A Urothelial Carcinoma Variant With a Predilection for Intraperitoneal Spread. *J Urol*. 2012;187(3):852-855. doi:10.1016/j.juro.2011.10.145
77. Lopez Beltran A, Montironi R, Cheng L. Microcystic urothelial carcinoma: morphology, immunohistochemistry and clinical behaviour. *Histopathology*. 2014;64(6):872-879. doi:10.1111/his.12345
78. Gaisa NT, Braunschweig T, Reimer N, et al. Different immunohistochemical and ultrastructural phenotypes of squamous differentiation in bladder cancer. *Virchows Arch*. 2011;458(3):301-312. doi:10.1007/s00428-010-1017-2
79. Bostwick DG, Cheng L. *Urologic Surgical Pathology*. 3. ed. Elsevier Saunders; 2014.
80. Ge P, Wang ZC, Yu X, Lin J, He Q. Sensitivity of initial biopsy or transurethral resection of bladder tumor(s) for detecting histological variants on radical cystectomy. *BMC Urol*. 2015;15(1):46. doi:10.1186/s12894-015-0037-2
81. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507(7492):315-322. doi:10.1038/nature12965
82. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(8):3110-3115. doi:10.1073/pnas.1318376111
83. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093

84. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2014;11(7):400-410. doi:10.1038/nrurol.2014.129
85. Wirtz RM, Fritz V, Stöhr R, Hartmann A. Molekulare Klassifikation des Harnblasenkarzinoms: Mögliche Ähnlichkeit zum Mammakarzinom. *Pathol*. 2016;37(1):52-60. doi:10.1007/s00292-015-0134-8
86. Universimed. Medizin im Fokus. <https://www.universimed.com/ch/article/urologie-andrologie/molekulare-konsensussubtypen-histologische-einteilung-und-neue-patientenbezogene-und-zielgerichtete-therapien-2164167>. Accessed Mai 05, 2022.
87. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*. 2016;12:105-117. doi:10.1016/j.ebiom.2016.08.036
88. Miyamoto H, Izumi K, Yao JL, et al. GATA binding protein 3 is down-regulated in bladder cancer yet strong expression is an independent predictor of poor prognosis in invasive tumor. *Hum Pathol*. 2012;43(11):2033-2040. doi:10.1016/j.humpath.2012.02.011
89. Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA, et al. Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting. *Bladder Cancer*. 2016;2(1):37-47. doi:10.3233/BLC-150037
90. Seiler R, Ashab HAD, Erho N, et al. Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol*. 2017;72(4):544-554. doi:10.1016/j.eururo.2017.03.030
91. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-1747. doi:10.1093/annonc/mdr304
92. Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz LK. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol*. 1999;14(2):657-664. doi:10.14670/HH-14.657

93. Akhtar M, Rashid S, Gashir MB, Taha NM, Al Bozom I. CK20 and CK5/6 Immunohistochemical Staining of Urothelial Neoplasms: A Perspective. *Adv Urol.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/4920236
94. Wan YY. GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends Immunol.* 2014;35(6):233-242. doi:10.1016/j.it.2014.04.002
95. Bonacho T, Rodrigues F, Liberal J. Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review. *Biotech Histochem.* 2020;95(2):71-91. doi:10.1080/10520295.2019.1651901
96. Warrick JI, Walter V, Yamashita H, et al. FOXA1, GATA3 and PPAR γ Cooperate to Drive Luminal Subtype in Bladder Cancer: A Molecular Analysis of Established Human Cell Lines. *Sci Rep.* 2016;6(1):38531. doi:10.1038/srep38531
97. Eriksson P, Aine M, Veerla S, Liedberg F, Sjö Dahl G, Höglund M. Molecular subtypes of urothelial carcinoma are defined by specific gene regulatory systems. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):25. doi:10.1186/s12920-015-0101-5
98. Usary J, Llaca V, Karaca G, et al. Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene.* 2004;23(46):7669-7678. doi:10.1038/sj.onc.1207966
99. Mehra R, Varambally S, Ding L, et al. Identification of GATA3 as a Breast Cancer Prognostic Marker by Global Gene Expression Meta-analysis. *Cancer Res.* 2005;65(24):11259-11264. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2495
100. kConFab, Arnold JM, Choong DYH, et al. Frequent somatic mutations of GATA3 in non-BRCA1/BRCA2 familial breast tumors, but not in BRCA1-, BRCA2- or sporadic breast tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(2):491-496. doi:10.1007/s10549-008-0269-x
101. Khazaeli Najafabadi M, Mirzaeian E, Memar Montazerin S, Tavangar AR, Tabary M, Tavangar SM. Role of GATA3 in tumor diagnosis: A review. *Pathol - Res Pract.* 2021;226:153611. doi:10.1016/j.prp.2021.153611

102. Lai PBS, Chi TY, Chen GG. Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Apoptosis*. 2007;12(2):387-393. doi:10.1007/s10495-006-0571-1
103. Dowell SP, Wilson PO, Derias NW, Lane DP, Hall PA. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res*. 1994;54(11):2914-2918.
104. Spruck CH, Rideout WM, Olumi AF, et al. Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res*. 1993;53(5):1162-1166.
105. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of Nuclear p53 and Tumor Progression in Bladder Cancer. *N Engl J Med*. 1994;331(19):1259-1264. doi:10.1056/NEJM199411103311903
106. Ecke TH, Sachs MD, Lenk SV, Loening SA, Schlechte HH. TP53 gene mutations as an independent marker for urinary bladder cancer progression. *Int J Mol Med*. 2008;21(5):655-661.
107. Sidransky, M.D D, Hollstein, Ph.D M. CLINICAL IMPLICATIONS OF THE p53 GENE. *Annu Rev Med*. 1996;47(1):285-301. doi:10.1146/annurev.med.47.1.285
108. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Okada K, Fukuda M. Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res*. 1998;26(4):235-241. doi:10.1007/s002400050051
109. Nishiyama H, Watanabe J, Ogawa O. p53 and chemosensitivity in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2008;13(4):282-286. doi:10.1007/s10147-008-0815-x
110. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol*. 2005;6(9):678-686. doi:10.1016/S1470-2045(05)70315-6
111. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(10):3500-3504. doi:10.1073/pnas.83.10.3500

112. Sjö Dahl G, Eriksson P, Liedberg F, Höglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification: Urothelial carcinoma classification. *J Pathol.* 2017;242(1):113-125. doi:10.1002/path.4886
113. Fachgruppe Molekulare Urologie der Arbeitsgruppe urologische Forschung (AuF) der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Erben P, Becker C, Tsaui I, Stope MB, Todenhöfer T. Molekulare Subtypen des Urothelkarzinoms der Harnblase – Hintergründe und klinische Relevanz. *Urol.* 2021;60(1):81-88. doi:10.1007/s00120-020-01396-2
114. Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch Für Die Biomedizinische Analytik.* 2nd ed. 2013. Springer Vienna; 2013. doi:10.1007/978-3-7091-1190-1
115. Learn: immunohistochemistry - The Human Protein Atlas. Published online April 17, 2021.
116. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exp Biol Med.* 1941;47(2):200-202. doi:10.3181/00379727-47-13084P
117. Müller-Waldeck R. Kaplan-Meier & Co. Published online 2018.
118. Goel MK, Khanna P, Kishore J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *Int J Ayurveda Res.* 2010;1(4):274-278. doi:10.4103/0974-7788.76794
119. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 12: survival analysis. *Crit Care Lond Engl.* 2004;8(5):389-394. doi:10.1186/cc2955
120. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research.*; 1999. Accessed May 8, 2022. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/soton-ebooks/detail.action?docID=5784343>
121. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1972;34(2):187-202. doi:10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x
122. Koll FJ, Schwarz A, Köllermann J, et al. CK5/6 and GATA3 Defined Phenotypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer: Impact in Adjuvant Chemotherapy and Molecular Subtyping of Negative Cases. *Front Med.* 2022;9:875142. doi:10.3389/fmed.2022.875142

123. Robert Koch-Institut. Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Published online 2016. doi:10.17886/RKIPUBL-2016-014
124. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, et al. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut; 2021. doi:10.25646/8353
125. Abd El-Latif A, Watts KE, Elson P, Fergany A, Hansel DE. The sensitivity of initial transurethral resection or biopsy of bladder tumor(s) for detecting bladder cancer variants on radical cystectomy. *J Urol*. 2013;189(4):1263-1267. doi:10.1016/j.juro.2012.10.054
126. Samaratunga H, Delahunt B. Recently described and unusual variants of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Pathology (Phila)*. 2012;44(5):407-418. doi:10.1097/PAT.0b013e3283560172
127. Shah RB, Montgomery JS, Montie JE, Kunju LP. Variant (divergent) histologic differentiation in urothelial carcinoma is under-recognized in community practice: impact of mandatory central pathology review at a large referral hospital. *Urol Oncol*. 2013;31(8):1650-1655. doi:10.1016/j.urolonc.2012.04.009
128. Domanowska E, Jozwicki W, Domaniewski J, et al. Muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the human bladder: multidirectional differentiation and ability to metastasize. *Hum Pathol*. 2007;38(5):741-746. doi:10.1016/j.humpath.2006.11.001
129. Jozwicki W, Domaniewski J, Skok Z, Wolski Z, Domanowska E, Jozwicka G. Usefulness of histologic homogeneity estimation of muscle-invasive urinary bladder cancer in an individual prognosis: a mapping study. *Urology*. 2005;66(5):1122-1126. doi:10.1016/j.urology.2005.06.134
130. Billis A, Schenka AA, Ramos CC, Carneiro LT, Araújo V. Squamous and/or glandular differentiation in urothelial carcinoma: prevalence and significance in transurethral resections of the bladder. *Int Urol Nephrol*. 2001;33(4):631-633. doi:10.1023/a:1020597611645
131. Mitra AP, Bartsch CC, Bartsch G, Miranda G, Skinner EC, Daneshmand S. Does presence of squamous and glandular differentiation in urothelial carcinoma of the bladder at cystectomy portend poor prognosis? An intensive case-control analysis. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014;32(2):117-127. doi:10.1016/j.urolonc.2012.08.017

132. Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(1):60-66. doi:10.1016/s0959-437x(01)00265-9
133. Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, et al. Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2002;8(1):171-179.
134. Tiguert R, Bianco FJ, Oskanian P, et al. Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol.* 2001;166(6):2155-2160.
135. van Oers JMM, Wild PJ, Burger M, et al. FGFR3 Mutations and a Normal CK20 Staining Pattern Define Low-Grade Noninvasive Urothelial Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2007;52(3):760-768. doi:10.1016/j.eururo.2007.01.009
136. Wild PJ, Ikenberg K, Fuchs TJ, et al. p53 suppresses type II endometrial carcinomas in mice and governs endometrial tumour aggressiveness in humans. *EMBO Mol Med.* 2012;4(8):808-824. doi:10.1002/emmm.201101063
137. Kim GH, Cho YM, Kim SW, et al. Synaptophysin, CD117, and GATA3 as a Diagnostic Immunohistochemical Panel for Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Urinary Tract. *Cancers.* 2022;14(10):2495. doi:10.3390/cancers14102495
138. Wang G, Xiao L, Zhang M, et al. Small cell carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 81 cases. *Hum Pathol.* 2018;79:57-65. doi:10.1016/j.humpath.2018.05.005
139. Kaffash Nayeri R, Sadri M, Shahrokh H, et al. Small Cell Carcinoma of Bladder; Still A Diagnostic and Therapeutic Challenge: Seven Years of Experience and Follow-up in A Referral Center. *Urol J.* 2020;(2019: Instant). doi:10.22037/uj.v0i0.5289
140. Guo CC, Bondaruk J, Yao H, et al. Assessment of Luminal and Basal Phenotypes in Bladder Cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):9743. doi:10.1038/s41598-020-66747-7
141. Weyerer V, Stoehr R, Bertz S, et al. Prognostic impact of molecular muscle-invasive bladder cancer subtyping approaches and correlations with variant histology in a population-

based mono-institutional cystectomy cohort. *World J Urol.* 2021;39(11):4011-4019. doi:10.1007/s00345-021-03788-1

142. Sjödaahl G, Eriksson P, Lövgren K, et al. Discordant molecular subtype classification in the basal-squamous subtype of bladder tumors and matched lymph-node metastases. *Mod Pathol.* 2018;31(12):1869-1881. doi:10.1038/s41379-018-0096-5

143. Sjödaahl G. Molecular Subtype Profiling of Urothelial Carcinoma Using a Subtype-Specific Immunohistochemistry Panel. In: Schulz WA, Hoffmann MJ, Niegisch G, eds. *Urothelial Carcinoma.* Vol 1655. *Methods in Molecular Biology.* Springer New York; 2018:53-64. doi:10.1007/978-1-4939-7234-0_5

144. Olah C, Hahnen C, Nagy N, et al. A quantitative polymerase chain reaction based method for molecular subtype classification of urinary bladder cancer—Stromal gene expressions show higher prognostic values than intrinsic tumor genes. *Int J Cancer.* 2022;150(5):856-867. doi:10.1002/ijc.33809

145. Kim J, Kwiatkowski D, McConkey DJ, et al. The Cancer Genome Atlas Expression Subtypes Stratify Response to Checkpoint Inhibition in Advanced Urothelial Cancer and Identify a Subset of Patients with High Survival Probability. *Eur Urol.* 2019;75(6):961-964. doi:10.1016/j.eururo.2019.02.017

146. Hautmann RE, de Petriconi RC, Pfeiffer C, Volkmer BG. Radical Cystectomy for Urothelial Carcinoma of the Bladder Without Neoadjuvant or Adjuvant Therapy: Long-Term Results in 1100 Patients. *Eur Urol.* 2012;61(5):1039-1047. doi:10.1016/j.eururo.2012.02.028

147. Jue JS, Koru-Sengul T, Miao F, et al. Timing of adjuvant chemotherapy and overall survival following radical cystectomy. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2020;38(3):75.e15-75.e22. doi:10.1016/j.urolonc.2019.11.001

148. Burdett S, Fisher DJ, Vale CL, et al. Adjuvant Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data from Randomised Controlled Trials. *Eur Urol.* 2022;81(1):50-61. doi:10.1016/j.eururo.2021.09.028

149. Font A, Domènech M, Benítez R, et al. Immunohistochemistry-Based Taxonomical Classification of Bladder Cancer Predicts Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers*. 2020;12(7):1784. doi:10.3390/cancers12071784
150. Lotan Y, de Jong JJ, Liu VYT, et al. Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer with Nonluminal Subtype Derive Greatest Benefit from Platinum Based Neoadjuvant Chemotherapy. *J Urol*. 2022;207(3):541-550. doi:10.1097/JU.0000000000002261
151. Sjö Dahl G, Abrahamsson J, Holmsten K, et al. Different Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma Molecular Subtypes. *Eur Urol*. 2022;81(5):523-532. doi:10.1016/j.eururo.2021.10.035
152. Taber A, Christensen E, Lamy P, et al. Molecular correlates of cisplatin-based chemotherapy response in muscle invasive bladder cancer by integrated multi-omics analysis. *Nat Commun*. 2020;11(1):4858. doi:10.1038/s41467-020-18640-0
153. Bejrananda T, Kanjanapradit K, Saetang J, Sangkhathat S. Impact of immunohistochemistry-based subtyping of GATA3, CK20, CK5/6, and CK14 expression on survival after radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. *Sci Rep*. 2021;11(1):21186. doi:10.1038/s41598-021-00628-5
154. Morera DS, Hasanali SL, Belew D, et al. Clinical Parameters Outperform Molecular Subtypes for Predicting Outcome in Bladder Cancer: Results from Multiple Cohorts, Including TCGA. *J Urol*. 2020;203(1):62-72. doi:10.1097/JU.0000000000000351
155. Bernardo C, Eriksson P, Marzouka N al dain, Liedberg F, Sjö Dahl G, Höglund M. Molecular pathology of the non-luminal Ba/Sq-like and Sc/NE-like classes of urothelial tumours: An integrated immunohistochemical analysis. *Hum Pathol*. 2022;122:11-24. doi:10.1016/j.humpath.2022.01.006

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Wild für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Florestan Koll für die großartige Hilfe bei der Statistik und Auswertung der Ergebnisse sowie der finalen Durchsicht bedanken.

Zudem danke ich Frau Dr. Vanessa Henriques und Herrn Prof. Dr. Henning Reis, die meine Arbeit durch ihre Hilfe bei der lichtmikroskopischen Auswertung wesentlich mitgestaltet haben. Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Katrin Bankov meinen Dank aussprechen, die mich im Rahmen aller praktischen Tätigkeiten dieser Arbeit von Beginn an begleitet und tatkräftig unterstützt hat. Für die Bereitstellung aller klinischen Daten aus der Klinik für Urologie danke ich Frau Dr. Séverine Banek herzlich.

12 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „Molekulare Subklassifizierung des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase mittels Proteinexpression von CK5/6, CK20, GATA3, p53 und Synaptophysin“ im Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Peter Wild mit Unterstützung durch Dr. Florestan Koll ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:
Florestan J Koll, Alina Schwarz, Jens Köllermann, Severine Banek, Luis Kluth, Clarissa Wittler, Katrin Bankov, Claudia Döring, Nina Becker, Felix K H Chung, Peter J Wild, Henning Reis;
Frontiers in Medicine, Ausgabe 9/2022