

Aus der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

„Identifizierung neuer Biomarker im Urothelkarzinom“

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Maren Maubach 2025

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Irene Esposito

Meinem jüngeren Ich, das sich dieser großen Aufgabe
gestellt hat, sowie meiner Familie, für ihre Begleitung und
Unterstützung in jedem Schritt des Weges, gewidmet.

Zusammenfassung

Harnblasenkarzinome sind eine häufige Tumorerkrankung. Während etwa 75% der Patienten an einer nicht-muskelinvasiven Form (NMIBC) leiden, findet sich bei dem übrigen Viertel ein muskelinvasives Karzinom (MIBC). Insbesondere letztere neigen trotz lokaler chirurgischer, strahlentherapeutischer sowie medikamentöser Therapie zur Progression sowie zur Metastasierung. Eine Chemotherapie ist nur bei einem Teil dieser Patienten (40-60%) wirksam und kann in der Regel das Fortschreiten der Erkrankung nur kurzzeitig bremsen. Auch die neueste Erweiterung der Therapieregime, die Immun-Checkpoint-Inhibitoren, weisen mit ca. 25% nur ein geringes Therapieansprechen auf.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue möglichst hoch tumorspezifische Biomarker für neue Therapieansätze, z. B. mit T-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR-T-Zellen), zu identifizieren. Mögliche Kandidaten wurden initial über *in silico* Analysen von Daten aus Zelllinien und Patientengeweben ermittelt. Anschließend wurden diese anhand von Analysen im Zellmodell, auf mRNA-Ebene und schließlich über immunhistochemische Färbungen an manuell erstellten *tissue micro arrays* (TMA) auf Protein-Ebene weiter validiert. Bis heute gibt es zudem keine sicheren Marker, die ein Ansprechen oder Nicht-Ansprechen auf die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten vorhersagen könnten. Die Entdeckung solcher prädiktiver Biomarker könnte eine patientengerechte, personalisierte Therapie ermöglichen, und ausgeprägte Nebenwirkungen, wie z. B. eine Chemotherapie-assoziierte Toxizität, vermeiden. Ein weiteres Ziel dieses Projekts war daher die Untersuchung eben solcher prädiktiver Biomarker, zunächst für den Einsatz einer neoadjuvanten Chemotherapie (NAC), ebenfalls über immunhistochemische Färbungen an den TMA. Hierfür wurde die Kohorte in drei Gruppen unterteilt: Patienten mit gutem, moderatem und schlechtem Ansprechen auf die NAC. Anschließend wurde die prätherapeutische Expression möglicher prädiktiver Marker zwischen diesen Gruppen verglichen.

Wie bereits oben beschrieben erfolgte die Ermittlung der möglichst tumorspezifischen Biomarker in einem Drei Stufen Modell. *In silico* zeigten sich folgende Targets interessant: *RIMS2*, *RAB26*, *NPTXR*, *FAM129A*, *FAM129B*, *ADAM22*, *PTPRN*, *DLL3*, *RAPSN*, *MAGEA1*, *ALPP* und *TERT*. In Zellen konnten folgende Gene validiert werden: *ADAM22*, *FAM129A*, *TERT* und *ALPP*. Zusätzlich wurden ebenfalls *BCL2*, *BIRC5*, *NECTIN4* und *TROP2* analysiert. In Geweben konnten dann noch die folgenden gemessen werden: *TERT*, *NECTIN4* und *TROP2*. *NECTIN4* und *TROP2* waren zudem höchst tumorspezifische Targets, sind aber als bereits in der Antikörper-Konjugat-Therapie eingesetzte Targets auch schon als solche bekannt. Bei *TERT* entfiel aufgrund technischer Schwierigkeiten ein Vergleich mit validen Normalkontrollen, trotz der durchweg hohen Tumorexpression konnte eine Selektivität somit nicht bewiesen werden. Dennoch erscheint der mögliche Einsatz von *TERT* als Target für zielgerichtete Therapien als ein

interessanter Ansatz, der in Zukunft genauer exploriert werden könnte. Ebenfalls bemerkenswert in unseren Ergebnissen war eine Zunahme des Anteils und der Intensität von positiven TROP2-Proben im Verlauf vom Primärtumor zu Metastasen.

In der Untersuchung möglicher prädiktiver Marker für die NAC zeigte sich Ki67 als vielversprechend. Die prä-therapeutische Expression war signifikant höher in der Gruppe von Patienten, die nach NAC eine vollständige *Response* erreichten. Auch TERT zeigte ein interessantes Expressionsmuster, je höher die TERT-Expression, desto schlechter war das Ansprechen. Signifikant war dieser Unterschied allerdings nicht, auch wenn sich dieser Trend deutlich erkennen ließ.

Wenn es in Zukunft möglich wäre, das Ansprechen auf der Grundlage von Grenzwerten für die immunhistochemische Bestimmung z.B. der Ki67-Expression vor der Behandlung vorherzusagen, könnte dies die klinische Routine bei der Entscheidung zu adjuvanten oder neoadjuvanten Therapien unterstützen. Aufgrund der begrenzten Größe der Kohorte sollte dies anhand größerer Stichproben validiert werden.

Summary

Urinary bladder carcinomas are a common tumor disease. While around 75% of patients suffer from a non-muscle-invasive form (NMIBC), the remaining quarter have a muscle-invasive carcinoma (MIBC). The latter in particular tend to progress and metastasize despite local surgical, radiotherapeutic and drug therapy. Chemotherapy is only effective in some of these patients (40-60%) and can usually only slow the progression of the disease for a short time. Even the latest addition to the treatment regimen, immune checkpoint inhibitors, have only a low response rate of around 25%.

One aim of this work was to identify new biomarkers that are as highly tumor-specific as possible for new therapeutic approaches, e.g. with T cells with a chimeric antigen receptor (CAR-T cells). Possible candidates were initially identified using *in silico* analyses of data from cell lines and patient tissues. These were then further validated using analyses in the cell model, at the mRNA level and finally via immunohistochemical staining on manually created *tissue micro arrays* (TMA) at the protein level. To date, there are also no reliable markers that could predict a response or non-response to the various treatment options. The discovery of such predictive biomarkers could enable patient-specific, personalized therapy and avoid pronounced side effects, such as chemotherapy-associated toxicity. Therefore, a further aim of this project was to investigate such predictive biomarkers, initially for the use of neoadjuvant chemotherapy (NAC), also using immunohistochemical staining of the TMA. For this purpose, the cohort was divided into three groups: Patients with good, moderate and poor response. The pre-therapeutic expression of possible predictive markers was then compared between these groups.

As already described above, the determination of the most tumor-specific biomarkers was carried out in a three-stage model. The following *targets* proved to be interesting *in silico*: *RIMS2*, *RAB26*, *NPTXR*, *FAM129A*, *FAM129B*, *ADAM22*, *PTPRN*, *DLL3*, *RAPSN*, *MAGEA1*, *ALPP* and *TERT*. The following genes were validated in cells: *ADAM22*, *FAM129A*, *TERT* and *ALPP*. In addition, *BCL2*, *BIRC5*, *NECTIN4* and *TROP2* were also analyzed. The following candidates were also measured in tissues: *TERT*, *NECTIN4* and *TROP2*. *NECTIN4* and *TROP2* were also highly tumor-specific *targets*, but are already known as *targets* used in antibody-conjugate therapy. In the case of *TERT*, a comparison with valid normal controls was not possible due to technical difficulties; despite the consistently high tumor expression, selectivity could therefore not be proven. Nevertheless, the possible use of *TERT* as a *target* for *targeted* therapies appears to be an interesting approach that could be explored in more detail in the future. Also noteworthy in our results was an increase in the proportion and intensity of positive *TROP2* samples in the progression from primary tumor to metastases.

In the investigation of possible predictive markers for NAC, Ki67 showed promise. The pre-therapeutic expression was significantly higher in the group of patients who achieved a complete *response* after NAC. TERT also showed an interesting expression pattern, the higher the TERT expression, the worse the response. However, this difference was not significant, even though this trend was clearly recognizable.

If it were possible in the future to predict response based on threshold values for the immunohistochemical determination of e.g. Ki67 expression prior to treatment, this could support clinical routine when deciding on adjuvant or neoadjuvant therapies. Due to the limited size of the cohort, this should be validated using larger samples.

Abkürzungsverzeichnis

AC	<i>Adjuvante Chemotherapie</i>
APC	<i>Antigenpräsentierenden Zelle</i>
BCG	<i>Bacillus-Calmette-Guerin</i>
CAR-T-Zell	<i>Chimeric antigen receptor t-cell</i>
cDNA	<i>Komplementäre Desoxyribonukleinsäure</i>
CPS	<i>Combined positivity score</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
dsDNA	<i>Double strand DNA</i>
ECOG-Score	<i>Eastern Cooperative Oncology Group Score</i>
ED	<i>Erstdiagnose</i>
Epi-inf	<i>Epithelial-infiltrated</i>
FFPE	<i>Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe</i>
FISH	<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>
GFR	<i>Glomeruläre Filtrationsrate</i>
GU	<i>Genomically unstable</i>
HDI	<i>Human development index</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HNPPCC	<i>Hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom</i>
H-Score	<i>Histochemical Score</i>
IC	<i>Immune Cell Score</i>
ICI	<i>Immun-Checkpoint-Inhibitor</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
KI	<i>Konfidenzintervall</i>
MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
Mes-like	<i>Mesenchymal-like</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIBC	<i>Muscle-invasive-bladder cancer</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
NAC	<i>Neoadjuvante Chemotherapie</i>
NE	<i>Neuroendocrine-like</i>
NMIBC	<i>Non-muscle-invasive-bladder cancer</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
Pall	<i>Palliative Chemotherapie</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PF	<i>Primer forward</i>
PR	<i>Primer reverse</i>
PREC	<i>Prostataepithelzellen</i>
PUNLMP	<i>Papilläre urotheliale Neoplasien mit geringem malignem Potenzial</i>
qRT	<i>Quantitative real time</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT	<i>Real time</i>
sc/NE	<i>Small-cell/neuroendocrine-like</i>
SCCL/Mes-Inf	<i>Squamous cell carcinoma-like/Mesenchymal-infiltrated</i>
scFv	<i>Single-chain-variable-fragment</i>
TAA	<i>Tumorassoziierte Antigene</i>
TAM	<i>Tumorassoziierten Makrophagen</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR	<i>T-Zell-Rezeptor</i>

TIL
TMA
TUR-B
UKD
URO
WHO

Tumorinfiltrierenden Lymphozyten
Tissuemicroarrays
Transurethrale Resektion der Blase
Universitäts-Klinikum-Düsseldorf
Urothelial-like
Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie des Urothelkarzinoms der Harnblase.....	1
1.2. Pathologische Charakteristika	2
1.2.1. Histologie	2
1.2.2. Makroskopie.....	3
1.3. Risikofaktoren.....	3
1.4. Stadieneinteilung.....	4
1.5. Klinik & Diagnostik.....	6
1.6. Pathogenese.....	7
1.7. Therapie	8
1.7.1. Zellbasierte Immuntherapien	10
1.8. Molekulare Subtypisierung	12
1.9. Ziele der Arbeit	15
2. Material und Methode	16
2.1. Patientenkollektiv.....	16
2.2. Bezugsquellen nachweis	16
2.2.1. Chemikalien	16
2.2.2. Verbrauchsmaterialien	17
2.2.3. Geräte	17
2.2.4. Software	19
2.2.5. Antikörper	20
2.2.6. Primer.....	20
2.2.7. Substanzen für Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR.....	22
2.2.8. Substanzen für Immunhistochemie	22
2.2.9. Zelllinien	23
2.2. Biochemische Untersuchungen auf RNA Ebene	26

2.2.1. Reverse Transkription für semi-quantitative Real-Time PCR	26
2.2.2. Quantitative Real-Time PCR	27
2.3 <i>Tissue microarrays</i>	29
2.4 Immunhistochemische Färbung und Auswertung.....	29
2.5 Statistische Analyse	32
2.6 Molekulare Subtypisierung	32
3. Ergebnisse	33
3.1. In silico Analysen zur Identifikation neuer Kandidaten für Antitumortherapien	33
3.2. In vitro Validierung der Kandidaten an Zelllinien	35
3.3. In vitro Validierung der Kandidaten an mRNA aus Patientengeweben.....	41
3.4. Patienten-Kohorte der TMA-Analyse	46
3.4.1 Überlebensanalyse	47
3.5 Validierung von Kandidaten mittels immunhistochemischer Färbung eines TMAs	51
3.6. Klinische und Molekularpathologische Charakterisierung	57
3.6.1. Molekulare Subtypen	57
3.6.2. Charakterisierung von Immunmarkern	62
3.6.3. Analyse der Proliferationsrate	70
3.7. Untersuchung prädiktiver Biomarker für die Neoadjuvante Chemotherapie.....	71
3.7.1 Überlebensanalyse der pTNM-Gruppen	75
4. Diskussion	77
 4.1 Diskussion der Methodik	78
4.1.1. In silico Analysen zur Identifikation neuer Kandidaten für Antitumortherapien.....	78
4.1.2 Quantitative Real-Time PCR	79
4.1.3. <i>Tissue microarrays</i>	80
4.1.3. Immunhistochemische Färbung und Auswertung.....	86
 4.2 Diskussion der Ergebnisse	89
4.2.1. In vitro Validierung der Kandidaten an Zelllinien	89
4.2.2. In vitro Validierung der Kandidaten an mRNA aus Patientengewebe.....	94
4.2.3 Validierung von Kandidaten mittels immunhistochemischer Färbung eines TMAs	95

4.2.4 Molekulare Subtypen	100
4.2.5. Charakterisierung von Immunmarkern	101
4.2.6. Analyse der Proliferationsrate	104
4.2.7. Untersuchung prädiktiver Biomarker für die neoadjuvante Chemotherapie.....	105
4.3 Schlussfolgerung und Zusammenfassung	109
5. Literatur- und Quellenverzeichnis	111
Literaturverzeichnis	111
6. Danksagung	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flowchart zu dem Vorgehen bei den <i>in silico</i> Analysen zur Identifikation möglicher Kandidaten für eine Antitumortherapie.....	34
Abbildung 2: Relative ADAM22 Expression in Zelllinien.....	35
Abbildung 3: <i>Relative FAM129A Expression in Zelllinien.</i>	36
Abbildung 4: Relative RIMS2 Genexpression in Zelllinien.....	37
Abbildung 5: Relative NPTXR Expression in Zelllinien.	37
Abbildung 6: Relative FAM129B Expression in Zelllinien.	38
<i>Abbildung 7: Relative TERT Expression in Zelllinien.</i>	39
<i>Abbildung 8: Relative MAGEA1 Expression in Zelllinien.</i>	39
<i>Abbildung 9: Relative ALPP Expression in Zelllinien.</i>	40
Abbildung 10: Übersicht zum Verlauf der <i>in vitro</i> Analysen.	40
<i>Abbildung 11: Relative ADAM22 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	41
<i>Abbildung 12: Relative FAM129A Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	42
<i>Abbildung 13: Relative TERT Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	43
<i>Abbildung 14: Relative ALPP Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	43
<i>Abbildung 15: Relative BIRC5 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	44
<i>Abbildung 16: Relative BCL2 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	44
<i>Abbildung 17: Relative NECTIN4 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	45
<i>Abbildung 18: Relative TROP2 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.</i>	46
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der gesamten Kohorte.	48
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der ICI-Therapiegruppe.....	49
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der NAC-Therapiegruppe.	49
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der AC-Therapiegruppe.....	50
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der Palliativen-Therapiegruppe.....	50
Abbildung 24: EGFR Auswertungs-Skala.....	52
Abbildung 25: CD44v6 Auswertungs-Skala	52
Abbildung 26: TROP2 H-Score Skala.	52
Abbildung 27: NECTIN4 H-Score Skala.....	52
Abbildung 28: TERT IRS Skala.....	53
Abbildung 29: NECTIN4 Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen.	54
Abbildung 30: TROP2 Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen.	54
Abbildung 31: EGFR Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen.	55

<i>Abbildung 32: CD44v6 Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen.</i>	55
<i>Abbildung 33: cytoplasmatische TERT Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen.</i>	56
<i>Abbildung 34: nukleäre TERT Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen.</i>	56
<i>Abbildung 35: Für die immunhistochemische Subtypisierung von muskelinvasivem Blasenkrebs vorgeschlagener Algorithmus.</i>	58
<i>Abbildung 36: Beispielhafte Färbungen der von Sjödahl et al vorgeschlagenen Subtypen.</i> ...	59
<i>Abbildung 37: Prozentualer Anteil der molekularen Subtypen in den TURBs, dargestellt für die gesamte Kohorte und die Therapiegruppen</i>	60
<i>Abbildung 38: Prozentualer Anteil der molekularen Subtypen in den Zystektomien, dargestellt für die gesamte Kohorte und die Therapiegruppen.</i>	61
<i>Abbildung 39: CD4-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment.</i>	63
<i>Abbildung 40: CD8-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment.</i>	64
<i>Abbildung 41: FOXP3-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment.</i>	66
<i>Abbildung 42: LAG3-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment.</i>	66
<i>Abbildung 43: TIGIT-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment.</i>	67
<i>Abbildung 44: PD-L1-Expression, IC-Score.</i>	68
<i>Abbildung 45: PD-L1-Expression, CPS.</i>	69
<i>Abbildung 46: PD-1-Expression..</i>	70
<i>Abbildung 47: Ki67-Expression in den drei Eingriffstypen.</i>	71
<i>Abbildung 48: Ki67-Expression in den pTNM-Gruppen.</i>	72
<i>Abbildung 49: Nukleäre TERT-Expression in den pTNM-Gruppen.</i>	73
<i>Abbildung 50: Cytoplasmatische TERT-Expression in den pTNM-Gruppen.</i>	74
<i>Abbildung 51: NECTIN4-Expression in den pTNM-Gruppen.</i>	74
<i>Abbildung 52: TROP2-Expression in den pTNM-Gruppen.</i>	75
<i>Abbildung 53: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der pTNM Gruppem 1-3.</i>	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Urothelkarzinome, 2016	2
Tabelle 2: TNM-Klassifikation (UICC, 2016)	4
Tabelle 3: Stadien-Einteilung (UICC, 2016).....	5
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper	20
Tabelle 5: Verzeichnis der verwendeten Primer (Luna)	20
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primer (SYBR-Green).....	21
Tabelle 7: Substanzen für Immunhistochemie	22
Tabelle 8: verwendete Zelllinien.....	23
Tabelle 9: RNA extrahiert aus tumorösem und gesundem Blasengewebe	25
Tabelle 10: Master Mix 1 für Reverse Transkription.....	26
Tabelle 11: Master Mix 2 für Reverse Transkription.....	27
Tabelle 12: Zyklus/Temperaturprogramm für die Reverse Transkription	27
Tabelle 13: Reaktionsmix für Agarose-Gelelektrophorese	27
Tabelle 14: Reaktionsmix für quantitative Real-Time PCR.....	28
Tabelle 15: Programm für quantitative Real-Time PCR im Light Cycler ® 96 SW 1.1 (Luna®).....	28
Tabelle 16: Programm für quantitative Real-Time PCR im Light Cycler ® 96 SW 1.1 (SYBR-Green®)	28
Tabelle 17: Daten zum Patientenkollektiv, getrennt dargestellt für die NAC/AC und Pall/ICI Gruppen.....	47
Tabelle 18: Anteil positiver Proben pro Marker.....	57
Tabelle 19: Gruppeneinteilung nach pTNM-Stadium.....	72

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Urothelkarzinoms der Harnblase

Die geschätzte Anzahl an Blasenkrebs-Neuerkrankungen lag 2020 bei 573.278 weltweit mit insgesamt 212.536 Todesfällen. Damit steht Blasenkrebs auf Platz zehn der häufigsten Krebsarten weltweit und auf Platz eins der häufigsten bösartigen Erkrankungen des Harnsystems (Hepp *et al.* 2021). 440.864 dieser Fälle traten dabei bei Männern, 132.414 bei Frauen, auf. 158.785 Männer und 53.751 Frauen verstarben. Männer sind also allgemein häufiger betroffen. Im Jahre 2020 lag die Inzidenzrate pro 100.000 für Männer bei 9,5, die Mortalitätsrate bei 3,3, im Vergleich dazu lagen eben diese für Frauen bei 2,4 und 0,9, also im Vergleich bei weniger als einem Viertel. Die Inzidenzentwicklungen der beiden Geschlechter verhalten sich allerdings gegenläufig. Die Inzidenzrate des männlichen Geschlechts bleibt größtenteils konstant oder ist sogar rückläufig, während die der Frauen ansteigt (Antoni *et al.* 2017). Neuere Daten aus den USA beschrieben eine Anzahl von 82.290 Neuerkrankungen und 16.710 Todesfällen im Jahre 2023 in den vereinigten Staaten (Siegel *et al.* 2023).

Global betrachtet treten die höchsten Inzidenzraten für beide Geschlechter in Südeuropa, insbesondere in Griechenland, Spanien und Italien, auf, gefolgt von Westeuropa und Nordamerika. Die höchste Inzidenzrate für Männer ist in Griechenland, für Frauen in Ungarn zu verzeichnen (Sung *et al.* 2021). Diese geografischen Unterschiede zeigen außerdem einen Zusammenhang mit dem jeweiligen Index der menschlichen Entwicklung (HDI, „*human development index*“). 55% der Blasenkrebsfälle und 43% der daraus folgenden Todesfälle traten in nur 20% der Weltbevölkerung auf, und zwar in der, die in Ländern mit einem sehr hohen HDI leben. Dem entgegengesetzt traten in Ländern mit niedrigem HDI nur 5% der Blasenkrebsfälle auf (Antoni *et al.* 2017). Insgesamt ist die Sterblichkeitsrate rückläufig, insbesondere in den weiter entwickelten Ländern. Staaten, die sich in einem rasanten Wirtschaftswandel befinden, wie z. B. Mittel- und Südamerika, bilden hier allerdings die Ausnahme (Antoni *et al.* 2017).

In der Regel wird Blasenkrebs im höheren Alter diagnostiziert, das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt für Männer bei 69 und für Frauen bei 73 Jahren (Miyazaki und Nishiyama 2017). Die 5 Jahres-Überlebensrate ist weiterhin gering und liegt bei 60% für Patienten mit lokalem Befund und bei <10% für Patienten mit Fernmetastasen (Kamoun *et al.* 2020). Ungefähr 60% der Patienten erleiden bereits innerhalb von zwei Jahren ein Rezidiv, in 25% der Fälle handelt es sich dabei um ein progressives Stadium (Yu *et al.* 2021).

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt bei 75% der Patienten ein nicht-muskelinvasier Tumor vor. 25% der Patienten erhalten allerdings die Diagnose eines die Muskulatur infiltrierenden, also

eines invasiven, Tumors. Die Behandlung der Patienten passt sich an diese Klassifikation an (Yu *et al.* 2021).

1.2. Pathologische Charakteristika

1.2.1. Histologie

Der Begriff „Blasenkrebs“ wird oft synonym zu „Urothelkarzinom“ verwendet, fasst aber eigentlich sämtliche histologische Klassifikationen zusammen. Das Urothelkarzinom macht allerdings mit einem Anteil von über 90% mit Abstand die häufigste Variante aus (Matulay *et al.* 2019), in seltenen Fällen liegen aber auch Adenokarzinome (ca. 1%) oder Plattenepithelkarzinome (ca. 2%) vor (Klaile *et al.* 2016); letzteres insbesondere in Assoziation mit der Bilharziose (Berry *et al.* 2017). Weitere sehr seltene Formen sind z. B. neuroendokrine oder kleinzellige Karzinome der Blase sowie das Urachuskarzinom (Klaile *et al.* 2016).

Urothelkarzinome zeichnen sich durch ihre große intratumorale Heterogenität aus und können eine weite Variation an histologischen Mustern aufweisen (Lopez-Beltran *et al.* 2019). Zuerst wurde 2004 durch die WHO eine Leitlinie publiziert, die diese unterschiedlichen Muster definierte und Hilfestellungen zur Erkennung in der pathologischen Untersuchung stellte (Kim *et al.* 2020). Eine Überarbeitung und Verfeinerung wurden zuletzt 2022 veröffentlicht (Compérat *et al.* 2022). In der folgenden Tabelle sind diese histologischen Varianten dargestellt. Sowohl reine als auch gemischte Formen können vorliegen (Matulay *et al.* 2019).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Urothelkarzinome, 2022 (Compérat *et al.* 2022)

Urothelkarzinome
Infiltrierendes Urothelkarzinom
Urothelkarzinom mit divergenter Differenzierung:
Squamös
Glandular
Trophoblastisch
Müllersche
„Nested“
Mikrozystisch/Tubulär
Mikropapillär
<i>Lymphoepithelioma-like</i>
Plasmacytoid/Siegelring/diffuse
Sarcomatoid

Riesenzell
Schlecht differenziert
Lipid-reich
Klarzelliges (glykogenreiches)
„large nested subtype“

1.2.2. Makroskopie

Urothelkarzinome können im gesamten von Urothel ausgekleideten Harntrakt entstehen. Häufigster Entstehungsort ist die Harnblase, in 90-95% der Fälle entsteht hier der Primarius. Diese Entitäten werden, zusammen mit den sehr seltenen Urothelkarzinomen der proximalen Harnröhre, auch als Karzinome des unteren Harntrakts bezeichnet. Urothelkarzinome des oberen Harntrakts, also des Harnleiters oder des Nierenbeckens, machen nur 5-10% der Fälle bei Erstdiagnose aus (Kim *et al.* 2015). Durch diese ungleiche Verteilung wird der Großteil des therapeutischen Vorgehens bei Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts auf Erkenntnissen basiert, die aus Studien zu Patienten mit einem Karzinom der Harnblase stammen (Green *et al.* 2013). Verschiedene Studien weisen allerdings darauf hin, dass sich die beiden Lokalisationen sowohl in ihrer klinischen Darstellung als auch epidemiologisch und molekular unterscheiden (Yates und Catto 2013). Die Kohorte, die in dieser Arbeit weiter analysiert wurde, enthält daher nur Patienten mit Urothelkarzinomen der Harnblase.

1.3. Risikofaktoren

Sowohl genetische als auch erworbene Risikofaktoren für die Entstehung eines Urothelkarzinoms wurden bereits beschrieben.

Der einzige sicher definierte genetische Risikofaktor ist das Vorliegen eines Lynch-Syndroms (AWMF 2020), auch bekannt als hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom (HNPCC). Besonders wenn eine Mutation des MSH2 Gens vorliegt, ist das Risiko sowohl von Blasenkrebs als auch von Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts erhöht (Lindner *et al.* 2021).

Der Risikofaktor, dem die größte Relevanz zugeschrieben wird, ist das Rauchen. Im Jahre 2014 wurden in den USA 39% der Blasenkrebsfälle von Frauen und 49% der Fälle von Männern auf das Rauchen zurückgeführt (Sung *et al.* 2021). Je länger und je mehr man raucht, desto höher ist das persönliche Risiko. Ein weiterer Anstieg von diesem kann durch eine Nikotin-Abstinenz verhindert werden. Auch bestimmte Kanzerogene können Urothelkarzinome auslösen, dazu zählen unter anderem Cyclophosphamid, Chlornaphazin, Phenazetin, Aristolochiasäure und

bestimmte aromatische Amine. Vorbelastet sind hier bestimmte Berufsgruppen, so z. B. Lackierer und Maler oder Angestellte der Gummiindustrie. Chronische Entzündungen der Harnblase wirken sich ebenfalls negativ aus und können z. B. auch durch lang-andauernde Katheterisierung ausgelöst werden. Einen Sonderfall stellt die Bilharziose dar, ausgelöst durch eine Infektion mit Schistosomiasis. Plattenepithelkarzinome der Blase treten hier um 59-81% häufiger auf (AWMF 2020). Verbreitet sind diese Erreger insbesondere in Afrika, aber auch im Nahen Osten, Südost- und Ostasien, jeweils mit spezifischen vorherrschenden Arten (Colley *et al.* 2014). Auch iatrogene Risikofaktoren liegen vor, so z. B. die Strahlentherapie des kleinen Beckens bei Vorliegen eines Zervixkarzinoms (AWMF 2020). Zusätzlich scheint das männliche Geschlecht ein erhöhtes Risiko zu haben, zumindest ab dem 25. Lebensjahr. Mit steigendem Alter nimmt das Risiko sowohl bei Männern als auch Frauen kontinuierlich zu, dieser Anstieg ist bei Männern aber stärker beobachtet worden (AWMF 2020).

1.4. Stadieneinteilung

Die Beschreibung der Ausbreitung von Urothelkarzinomen wird anhand der pTNM-Klassifikation vorgenommen. Das „T“ beschreibt den Primärtumor und dessen Eindringtiefe in die Harnblasenwand bzw. Ausbreitung in das umliegende Gewebe. „N“ steht für „nodes“ und zeigt an, ob und wie viele benachbarte Lymphknoten mit Tumorzellen befallen sind. Gleiches gilt für „M“, allerdings in Bezug auf vorliegende Fernmetastasen (Wittekind 2010).

Die genaue Stadieneinteilung wird in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Tabelle 2: TNM-Klassifikation (UICC, 2016) (AWMF 2020)

T – Eindringtiefe/Ausbreitung des Primärtumors	
Tx	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Anhalt für das Vorliegen eines Primärtumors
Ta	Nicht-invasives papilläres Karzinom
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor infiltriert die Lamina propria
T2	Tumor infiltriert die Muscularis
T2a	Tumor infiltriert weniger als die Hälfte der Muscularis propria
T2b	Tumor infiltriert mehr als die Hälfte der Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert das perivesikale Gewebe
pT3a	Mikroskopische Invasion
pT3b	Makroskopische Invasion
T4	Invasion in ein Nachbarorgan

T4a	Prostata, Uterus und Vagina
T4b	Invasion des Beckens oder der Bauchdecke
N – Klassifizierung regionaler Lymphknoten	
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionale Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre Lymphknotenmetastase (hypogastrisch, obturatorisch, präsakral, extern iliakal)
N2	Multiple Lymphknotenmetastasen (hypogastrisch, obturatorisch, präsakral, extern iliakal)
N3	Lymphknotenmetastasierung entlang der Aa. Iliacae communes
M – Klassifizierung von Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasierung nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen liegen vor

Tabelle 3: *Stadien-Einteilung (UICC, 2016)*

Stadien-Einteilung			
Stage 0a	Ta	N0	M0
Stage 0is	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2a-b	N0	M0
Stage III	T3a-b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Stage IV	T4b	N0	M0
	Any T	N1-23	M0
	Any T	Any N	M1

Des Weiteren erfolgt gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation ein Grading in die Kategorien „high grade“ und „low grade“ Tumore. Auch eine Einteilung in drei unterschiedliche *Grade*, G1, G2 und G3, ist üblich (Epstein *et al.* 1998), da die gängigen Risikoklassifikationen beim Nicht-invasiven-Blasenkrebs noch überwiegend auf diesem älteren WHO-Grading aus dem Jahre 1973 basieren. Diese Einteilung erfolgt anhand der zellulären und architektonischen Atypien. Bei G1 Tumoren sind die Urothelzellen nahezu normal. Sie sind geordnet, die Zellgrenzen sind gut definiert, es liegen nur minimale Anomalien vor und Mitosen sowie Nekrosen treten nicht auf. G3 Tumore weisen die größte Heterogenität in ihrer Architektur auf. So zeigen z. B. Zellkerne

eine unregelmäßige Form und Membran, die Polarität der Zellen geht verloren und Mitosen und Nekrosen liegen gehäuft vor. Der G2-Grad fasst die Tumore zusammen, die sich weder dem G1 noch dem G3 Grad zuordnen lassen und deckt somit ein breites Spektrum von Läsionen ab (Kim *et al.* 2020; Wittekind 2010). G1 und mäßig differenzierte G2 Läsionen zählen zu den „low grade“, G3 und schlecht differenzierte G2 Läsionen zu den „high grade“ Tumoren. „Low“ und „high grade“ Karzinome wurden zuerst in der WHO/ISUP (Internationale Gesellschaft für Urologische Pathologie) Klassifikation von 1998 beschrieben (Epstein *et al.* 1998). Hier erfolgte neben dieser Unterteilung auch eine Einteilung in Papillome und „papilläre urotheliale Neoplasien mit geringem malignem Potenzial“ (PUNLMP). Aktualisierungen dieser Klassifikation folgten 2004, 2016 und zuletzt 2022. Die Einteilung in „low“ und „high grade“ bleibt erhalten, pTa- und pT1-Tumore werden in diese Kategorien eingeteilt während alle muskelinvasiven Urothelkarzinome als „high grade“ eingestuft werden (Compérat *et al.* 2019).

1.5. Klinik & Diagnostik

Urothelkarzinome äußern sich bei 80% der Patienten durch eine makroskopische Hämaturie (Sell *et al.* 2020). Diese kann sich auch auf einen mikroskopischen Nachweis beschränken, der Schweregrad der Erkrankung ist dabei nicht ausschlaggebend für das Ausmaß. Irritative Symptomatik wie vermehrtes Wasserlassen, Harndrang oder Dysurie sind seltener und kommen bei ca. 30% der Patienten vor. In invasiven oder metastasierten Stadien der Erkrankung können u. a. Flankenschmerzen, Völlegefühl im Becken oder ein Harnverhalt auftreten (Farling 2017).

Die Symptomatik eines Urothelkarzinoms ähnelt somit der einer Harnwegsinfektion, im diagnostischen Schema wird diese dementsprechend i. d. R. zuerst abgeklärt. Gängige Methoden sind hier die Urinanalyse, mikroskopisch oder mittels Urinstreifen, und die Urinkultur. Durch eine zytologische Untersuchung der Proben wird das Vorhandensein abnormaler Zellen untersucht, diese Methode weist allerdings nur eine geringe Empfindlichkeit für niedriggradige Läsionen auf. Eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) kann mit Urothelkarzinomen assoziierte Chromosomenstörungen nachweisen und die diagnostische Treffsicherheit der Zytologie erhöhen.

Neben den Methoden der Labordiagnostik kommen auch die Bildgebung mittels z. B. CT oder MRT sowie invasivere Vorgänge wie eine Zytoskopie zum Einsatz. Bei letzterem handelt es sich um den Goldstandard zur Diagnose eines Blasenkarzinoms. Oft schließt sich unmittelbar eine Biopsie oder Transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) an (Farling 2017).

1.6. Pathogenese

Die für die Therapie essenzielle Einteilung in nicht-muskelinvasiven und muskelinvasiven Blasenkrebs findet sich auch in Erklärungsansätzen der molekularen Pathogenese wieder. Diese beiden Krankheitsentitäten zeigen unterschiedliche molekulare Merkmale, klinisches Ansprechen und Entstehungswege. Dies wird auch als „Zwei-Wege-Modell“ bezeichnet (Goebell und Knowles 2010; Knowles und Hurst 2015).

Nach diesem Modell entsteht ein NMIBC auf dem Boden von Epithelhyperplasien, während sich MIBC aus flachen Dysplasien bzw. einem Carcinoma in situ entwickeln. Auf molekularer Ebene sind niedriggradige NMIBCs durch aktivierende Mutationen des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-3 (FGFR3), PIK3CA und des Stroma-Antigens 2 (STAG2) sowie durch einen Verlust der Heterozygotie des neunten Chromosoms gekennzeichnet. NMIBCs sind genetisch stabil, es treten allerdings häufig Rezidive auf. MIBCs hingegen sind genetisch instabil und weisen eine große Vielfalt an genomischen Aberrationen auf. Molekulare Charakteristika sind unter anderem Deletionen des Chromosom 9, RB1-Verluste und TP53-Mutationen. Sie weisen im Gegensatz zu den NMIBCs in der Regel nur selten FGFR-Mutationen auf. Es wurde allerdings ein Subtyp an invasiven Karzinomen entdeckt, der sowohl FGFR3-Mutationen als auch Verluste des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 2A (CDKN2A) vorwies. Es könnte also sein, dass auch niedriggradige NMIBCs über einen bestimmten Weg zu muskelinvasiven Formen übergehen können (Knowles und Hurst 2015).

FGFR3 Alterationen liegen bei bis zu 80% der papillären Ta-Tumoren vor, beim MIBC, also bei Tumoren, die sich mindestens im Stadium T2 befinden, liegt dieser Anteil bei nur 10-20% (Knowles und Hurst 2015). In Experimenten mit normalen humanen Urothelzellen (NHUCs) war der mutierte FGFR3 ein Aktivator des RAS-MAPK-Signalweg, welcher über verschiedene Mechanismen zu einem verbesserten Zellüberleben und erhöhter Zellteilung führt.

Auch der PI3K-Signalweg ist vermehrt überaktiv in urothelialen Karzinomen, diese Aktivierung wird über verschiedene Mechanismen erreicht. Unter anderem kann eine Überexpression von EGFR, dem epidermalen Wachstumsfaktor (auch bekannt als ERBB1), über eine RAS-Aktivierung den PI3K-Signalweg stimulieren. Auch ERBB2 und/oder ERBB3 weisen in einigen MIBCs Mutationen auf. Amplifikationen oder aktivierende Mutationen von Rezeptortyrosinkinasen wie MET und RON wurden ebenfalls beschrieben, insbesondere bei invasiven Urothelkarzinomen sind diese vermehrt exprimiert.

Die bereits oben erwähnte Deletion von Chromosom 9 ist eine häufige chromosomal Veränderung bei beiden Entitäten, sie liegt in über der Hälfte der Fälle vor. Betroffen davon sind die auf Chromosom 9 liegenden Tumorsuppressorgene CDKN2A und CDKN2B, welche für p16

und p14ARF einerseits und für p15 andererseits kodieren. Diese Proteine bilden einen zentralen Bestandteil des G1-Zellzykluskontrollpunktes (Hume *et al.* 2020). Weitere dort kontrollierende Proteine sind u. a. TP53 und RB1, auch hier liegen bei MIBC häufig inaktivierende Mutationen vor. Cycline stellen hier eine weitere zentrale Gruppe von Proteinen dar, insbesondere Cyclin 1 (CCND1) und CCND3 scheinen in NMIBC involviert zu sein. Eine Amplifikation von CCND1 liegt in ca. 20% der Blasenkrebs-Fälle vor (Knowles und Hurst 2015).

In Bezug auf den Karyotyp sind NMIBCs oft nahezu diploid, MIBCs dagegen sind meistaneuploid. Unter anderem weist diese Gruppe auch häufiger Chromothriksen auf, als Ursprung dieser fehlerhaften Reparatur wird nicht-homologes End-Joining vermutet. Auch inaktivierende Mutationen in Genen der DNA-Reparatur oder Zellzyklus-Kontrollpunkte wurden beschrieben (z. B. ERCC2, ATM, FANCA).

Diese genetischen Veränderungen tragen zu der großen Heterogenität im klinischen Verhalten von Urothelkarzinomen bei, können sie allerdings nicht vollends erklären. Weitere Mechanismen, wie z. B. Genexpressionsveränderungen durch epigenetische Modifikationen sind ebenfalls Ursache der ausgeprägten Heterogenität.

Ein neuerer Ansatz, dieser Heterogenität zu begegnen, sind Versuche, das Patientenkollektiv in sog. molekulare Subtypen zu unterteilen. Diese Unterteilung wird anhand genomweiter Daten zu genetischen Veränderungen und Genexpressionsprofilen vorgenommen. Diese Einteilung erweitert die herkömmliche Grad- und Stadieneinteilung. Eine Übersicht über verschiedene Publikationen und Untergruppen folgt in Abschnitt 1.8.

1.7. Therapie

Bestätigt sich in der diagnostischen Zystoskopie der Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom, besteht die Indikation zur transurethralen Tumorresektion (TUR-BT). Durch diesen Eingriff erfolgt die histologische Diagnosesicherung, auch die Invasionstiefe des Tumors wird durch diesen bestimmt. Bei Patienten, die an einem NMIBC erkrankt sind, stellt dieser Eingriff gleichzeitig auch die Therapie der Erkrankung dar. Abhängig vom Tumorbefund und davon, ob es sich um einen Erstbefund oder ein Rezidiv handelt, kann sich unmittelbar an die TUR-BT eine sogenannte Frühinstillation anschließen. Hier wird bis zu 24 h nach dem Eingriff ein Chemotherapeutikum, in aller Regel Mitomycin, in die Harnblase eingebracht, wodurch das Rezidivrisiko gesenkt werden kann (AWMF 2020).

Abhängig vom Risiko für ein Tumorrezidiv oder einen Tumorprogress schließt sich bei Patienten mit einem NMIBC eine Nachresektion an. Zusätzlich werden, in Abhängigkeit vom Rezidiv- und Progress-Risiko adjuvante Blaseninstillationstherapien eingesetzt. Instillationstherapie können

dabei mit dem attenuierteren Lebendimpfstoff *Bacillus-Calmette-Guerin* (BCG) (Woldu *et al.* 2017) oder der intravesikalen Chemotherapie durchgeführt werden (AWMF 2020).

Liegt ein muskelinvasives Stadium vor, besteht die Indikation zur radikalen Zystektomie und Lymphadenektomie mit anschließender Harnableitung. Ergänzt werden sollte dieser Eingriff, wenn immer möglich, durch eine perioperative Chemotherapie. Diese erfolgt für gewöhnlich mit Cisplatin-basierten Kombinationstherapien (z. B. mit Gemcitabin) über mehrere Zyklen (AWMF 2020). Ein pathologisches Therapieansprechen nach neoadjuvanter Chemotherapie zeigt sich bei 40-60% der Patienten, 20-40% der Patienten weisen eine Komplettremission auf, d.h. im Rahmen der Zystektomie ist kein Tumor mehr nachweisbar (Anari *et al.* 2018; Peyton *et al.* 2018; Iyer *et al.* 2020). Hierdurch wird das 5-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten um 5-8% verbessert (Yin *et al.* 2016). Zusätzlich werden seit kurzem Immuncheckpoint-Inhibitoren in der adjuvanten Therapie des muskelinvasiven UCs eingesetzt (Bajorin *et al.* 2021; Apolo *et al.* 2024). Ein Problem der neoadjuvanten Therapie ist, dass nicht alle Patienten auf diese Behandlung ansprechen und potenziell während der Chemotherapie der Tumor auch fortschreiten kann. Hierdurch könnte sich die Prognose verschlechtern (Zargar *et al.* 2015). Weiterhin sind nicht alle Patienten für eine Cisplatin-basierte Therapie geeignet. Prädiktive Biomarker, die das Ansprechen auf diese Therapien vorhersagen und somit einen individualisierten Therapieansatz ermöglichen könnten, gibt es aktuell noch nicht.

Die Cisplatin-basierte Chemotherapie ist seit über 30 Jahren die standardhaft durchgeführte Behandlung. Auch bei Patienten im metastasierten Stadium wird die Cisplatin-basierte Chemotherapie eingesetzt, jedoch ist nicht jeder Patient für diese geeignet. Liegt ein ECOG-Score von ≥ 2 , ein signifikanter Hörverlust, periphere Polyneuropathie, eine Herzinsuffizienz im Stadium NYHA \geq Grad III oder eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) von ≤ 40 ml/min vor, muss alternativ Carboplatin eingesetzt werden. Eine GFR von 40-60 ml/min stellt eine relative Kontraindikation dar. Diese Alternative zeigt allerdings eine geringere Effektivität bei einer Ansprechratenrate von 41,2% im Vergleich zu 49% bei der Cisplatin basierten Standardtherapie (Amsberg *et al.* 2022). Die Standard-Kombinationschemotherapie mit Cisplatin zeigt sich also leider nur mäßig wirksam. Ein führendes Problem ist fortschreitende Entwicklung von Resistenzen und die dadurch zeitlich begrenzte therapeutische Wirkung (Thy *et al.* 2021). Eine Entwicklung neuer Therapieansätze ist also dringend erforderlich.

Die Immuntherapie mit Anti-PD1/ -PDL1 Immuncheckpoint-Inhibitoren stellt solch eine neue Therapiemöglichkeit für Patienten mit metastasierten Karzinomen dar, das Therapieansprechen bleibt allerdings auch hier mit etwa 25% gering (Song *et al.* 2019). Fünf unterschiedliche Substanzen sind seit 2016 zugelassen: Pembrolizumab und Nivolumab, gerichtet gegen PD-1, sowie Atezolizumab, Avelumab und Durvalumab, gerichtet gegen PD-L1. Eingesetzt werden

dürfen diese als Zweitlinientherapien. Pembrolizumab und Atezolizumab sind zusätzlich als Erstlinientherapien bei Patienten, die sich nicht für eine Cisplatin- oder Carboplatin-basierte Chemotherapie eignen, indiziert, wenn eine Überschreitung des Schwellenwertes der PD-L1 Expression immunhistochemisch bewiesen werden konnte (Lenis *et al.* 2020). Eine generelle Platin-Eignung liegt u.a. bei einem ECOG-Score von ≥ 3 oder einer GFR von <30 ml/min nicht mehr vor. Die Ansprechraten lagen bei in diesen Fällen bei 23% und 24% (Amsberg *et al.* 2022).

In diesem Kontext wurde kürzlich vielversprechende Daten zu einer Kombinationstherapie mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab sowie dem Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (ADC – *antibody-drug-conjugates*) Enfortumab-Vedotin publiziert. In einer Phase III Studie wurden unbehandelte metastasierte und/oder inoperable Urothelkarzinom-Patienten mit Enfortumab-Vedotin und Pembrolizumab als Kombinationstherapie behandelt. Diese Behandlung führte zu einer deutlichen Verbesserung sowohl des Tumoransprechens (+23,3%) als auch des (*hazard ratio* 0,45) als auch des Gesamtüberlebens (*hazard ratio* 0,47) verglichen mit einer platin-basierten Chemotherapie (Powles *et al.* 2024). Platin-basierte Kombinationstherapien werden aber auch weiterhin einen hohen Stellenwert haben. Zum einen ist die Behandlung mit Enfortumab-Vedotin und Pembrolizumab ungleich teurer und kann somit sicher nicht von allen Gesundheitssystemen übernommen werden, zum anderen ist zum aktuellen Zeitpunkt nach einer solchen neuen Erstlinientherapie der Einsatz Platin-basierter Kombinationen der Standard.

1.7.1. Zellbasierte Immuntherapien

Eine adoptive Immuntherapie, z. B. im Rahmen einer adoptiven T-Zell-Therapie, auch genannt CAR-T-Zell-Therapie, stellen weitere neue Formen der Immuntherapie von Blasenkrebs dar, die in den letzten Jahren verstärkt erforscht wurden (Nelson *et al.* 2021). Diese Ansätze benötigen hochgradig spezifische Tumormarker.

Der Anfang der adoptiven T-Zell-Therapie lag in der Entdeckung der so genannten „tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)“. Diese werden aus dem Tumorgewebe isoliert und nach einer ex-vivo-Vermehrung dem Patienten zurückgespendet. Diese Idee kam auf, als erkannt wurde, dass eine bessere Prognose nach der Therapie mit dem Vorliegen von infiltrierenden Immunzellen im Tumorgewebe korreliert (Muthigi *et al.* 2016).

Im Bereich der Therapie des Melanoms hat sich diese Methode als aussichtsreiches Therapieregime erwiesen. Dudley *et al.* berichten in ihrer Publikation aus dem Jahre 2005, dass 50% der Patienten mit fortgeschrittenem Melanom auf die Behandlung angesprochen haben. Dieser Erfolg hat sich allerdings nicht auf weitere Entitäten übertragen lassen, hierfür lassen sich verschiedene Ursachen erahnen: die TIL sind in anderen Krebsarten schwerer zu isolieren, die

Anzahl ist meist nicht ausreichend. Eine geringere Anzahl an Mutationen in anderen Krebsarten im Vergleich zum Melanom sowie eine verminderte Immunogenität der tumorassoziierten Antigene (TAA) anderer Entitäten könnte ebenfalls ursächlich sein (Duong *et al.* 2015). Außerdem handelt es sich bei der Gewinnung der TILs um ein invasives Verfahren und die Möglichkeit der ex-vivo-Proliferation muss gegeben sein (Brancato *et al.* 2015).

In einer 2010 durchgeführten Machbarkeitsstudie von Sherif *et al.* wurde die Isolation und Re-Infusion der TILs bei Patienten mit metastasierten Urothelkarzinomen angewandt, es liegen allerdings noch keine Langzeitergebnisse vor und es ist noch unklar, wie wirksam dieser Ansatz hier sein wird. Zu Beginn der Studie wurden 12 Patienten ausgewählt, bei sechs von diesen musste der Vorgang auf Grund von technischen Schwierigkeiten abgebrochen werden, bei den restlichen wurde die Infusion ohne jegliche unerwünschten Wirkungen vollzogen (Sherif *et al.* 2010).

Um eine Ausdehnung der Anwendung der Immuntherapie auf weitere Tumor-Entitäten zu ermöglichen, wurde das Verfahren gentechnisch weiterentwickelt: die nun aus dem peripheren Blut isolierten T-Zellen werden über virale Vektoren so transduziert, dass sie einen rekombinanten T-Zell-Rezeptor exprimieren, der ein spezifisches TAA erkennt. Die Zellen weisen nun also einen so genannten gentechnisch modifizierten Antitumor-T-Zell-Rezeptor (TCR) auf. Auch diese T-Zellen werden dem Patienten zurückgespendet (Muthigi *et al.* 2016). Voraussetzung ist hier natürlich, dass das gewählte spezifische Antigen auch von dem Tumor exprimiert wird. Es muss sich also um ein Antigen handeln, das von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) prozessiert und anschließend auf der Zellmembran über einen MHC-Rezeptor präsentiert wird. Die Wirkung dieser Therapie ist also auch eingeschränkt, wenn der Tumor die MHC-Moleküle herunterreguliert und sich vor den Immunzellen verbirgt (Duong *et al.* 2015). Außerdem wurde auch die Bildung potenziell autoreaktiver TCR beschrieben, in präklinischen Mausmodellen war hier wohl die Verbindung von endogenen und transduzierten TCR ursächlich (Bendle *et al.* 2010).

Um der MHC-Unterregulierung entgegenzuwirken, wurden sogenannte chimäre Antigenrezeptoren (CAR) entwickelt. Die hier ebenfalls peripher isolierten T-Zellen werden bei dieser Technik mit einem chimären Rezeptor transduziert. Dieser besteht zusätzlich aus einem single-chain-variable-fragment (scFv), also aus einer variablen Region einer Antikörperdomäne, die spezifisch ein ausgewähltes Antigen erkennt. Dieser Antikörper-Teil bindet das jeweilige Antigen, eine MHC-Bindung ist zur Aktivierung also nicht erforderlich (Brancato *et al.* 2015). Über Transmembrandomänen ist das scFv mit den intrazellulären Signaldomänen des TCR verbunden und kann so eine Aktivierung der T-Zelle bewirken.

Neben der Umgehung der MHC-Unterregulierung und der daraus resultierenden Immunflucht haben die CAR auch weitere Vorteile, so können sie z. B. auch gegen Lipid- oder

Kohlenhydratantigene gerichtet werden. Aber trotz des Fortschritts hat auch diese Methode noch ihre Nachteile: sollte der bekämpfte Tumor das ausgewählte Antigen herunterregulieren oder verlieren, kann er sich so erneut der Erkennung durch die CAR-T-Zellen entziehen (Duong *et al.* 2015).

In einer Publikation von Grunewald *et al* wurden zudem CAR-T-Zellen, die sich gegen die Antigene EGFR und CD44v6 richteten, mit Harnblasenkarzinom-Zelllinien, die zuvor entweder mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor (DNMTi) Decitabin oder dem Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) Romidepsin behandelt wurden, ko-inkubiert und anschließend eine Zytotoxizitätsanalyse vorgenommen (Grunewald *et al.* 2021). Die Messungen ergaben, dass eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit Decitabin die Effizienz der CAR-T-Zellen bei der Zerstörung der Tumorzellen verbessert.

Nach positiven präklinischen Resultaten wurde die Wirksamkeit der CAR gegen unterschiedliche Entitäten in diversen Studien getestet. In einer Studie mit drei an einem Neuroblastom erkrankten Patienten, die GD2-spezifische CAR erhalten haben, ließ sich erstmals ein vollständiges Ansprechen erreichen (Louis *et al.* 2011).

Alles in allem zeigt sich die adoptive T-Zell-Therapie also als verheißungsvoll, im Bereich der Urothelkarzinome wurde diese aber noch nicht vollständig exploriert. Da Urothelkarzinome aber eine große Anzahl an urothel-spezifischen Antigenen sowie eine hohe Mutationsrate aufweisen, lassen sich in der künftigen Forschung gute Ergebnisse erhoffen.

1.8. Molekulare Subtypisierung

Im Jahre 2012 wurde einer der ersten Ansätze zur klinisch relevanten molekularen Subtypisierung muskelinvasier-Urothelkarzinome veröffentlicht (Sjödahl *et al.* 2012) und somit ein Anfang, die große Heterogenität im Verhalten dieser Entität zu erklären. Es wurden fünf Subtypen definiert: „Urobasal A“, „*genomically unstable* (genomisch unstabil)“, „Urobasal B“, „*squamous cell carcinoma like* (Plattenepithelkarzinom-ähnlich)“ und „*infiltrated class of tumors* (stark von Nicht-Tumorzellen infiltriert)“. Um diese zu validieren, wurden drei unabhängige, öffentlich zugängliche Datensätze verwendet, bestehend aus Genexpressionsprofilen von 308 unterschiedlichen Tumoren. Die unterschiedlichen Subtypen zeichneten sich unter anderem durch differierende Expressionsmuster der Zytokeratine sowie von FGFR3-Expression oder Mutation oder bestimmte Mutationsprofile aus. Außerdem war zu vermerken, dass diese Subtypen ein unterschiedliches Überleben aufwiesen: Urobasal B und die Plattenepithelkarzinom-ähnliche Gruppe zeigten die schlechteste, die infiltrierten und genomisch instabilen eine moderate und Urobasal A eine gute Prognose auf.

Im Jahre 2014 folgten drei weitere Ansätze zur Subtypisierung, publiziert von Damrauer *et al*, Choi *et al* und dem TCGA.

Damrauer *et al* beschrieben ein Zwei-Gruppen-System, „luminal“ und „basal-like“, ähnlich zu den molekularen Subtypen von Brustkrebs. Identifiziert wurden diese durch ein Consensus-clustering, durchgeführt an Genexpressions-Daten eines Datensets aus *high-grade* MIBCs. Auch hier konnte ein signifikant geringeres Überleben der Tumore, die sich der basalen Gruppe zuordnen ließen, nachgewiesen werden. Außerdem definierte Damrauer *et al* das „BASE47 („*bladder cancer analysis of subtypes by gene expression*“)“, einen Gen-Set-Prädiktor, bestehend aus 47 Genen, der eine akkurate Klassifizierung in diese Subtypen gewährleisten sollte. Der basale Subtyp wies z. B. eine erhöhte Expression von KRT14, KRT5 und CD44 auf, während der lumineale Subtyp sich durch erhöhte Mengen an Uroplakinen und KRT20 auszeichnete (Damrauer *et al.* 2014).

Choi *et al* definierte neben den basalen und luminalen Subtypen einen Weiteren, die „p53-like MIBCs“. Diese Gruppe zeigte in der Studie eine permanente Resistenz gegen eine mit Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin und Doxorubicin durchgeführte neoadjuvante Chemotherapie. Die basalen MIBCs waren auch in dieser Studie die aggressivste Form der Erkrankung, daneben zeichneten sie sich durch eine plattenepithelartige Differenzierung und p63-Aktivierung aus. Die luminalen MIBCs wiesen u. a. aktivierende FGFR3-Mutationen sowie Hinweise auf eine aktivierte PPAR γ -Transkription auf (Choi *et al.* 2014).

Die RNA-Sequenzierungen von 129 Tumoren des TCGAs ergaben vier verschiedene Subtypen, „Cluster I-IV“ (TCGA 2014). Cluster I wurde auf Grund der mehrheitlichen papillären Morphologie als „papillary-like“ bezeichnet und wies außerdem eine erhöhte FGFR3 Expression sowie Mutationsrate und eine erhöhte Anzahl an FGFR3 Kopien auf. Cluster III wurde näher als „basal/squamous-like“ definiert, Cluster II und IV hingegen wurden nicht genauer benannt.

2015 konnten Aine *et al* nachweisen, dass sich diese Klassifizierungen hierarchisch ordnen lassen (Aine *et al.* 2015). Auf der höchsten Ebene erfolgt die Unterteilung in luminal und basal, welcher sich die drei-Typen-Klassifikation von Choi *et al* und anschließend die vier-Typen-Klassifikation des TCGA unterordnen lassen. Der luminele Subtyp auf der höchsten Ebene lässt sich nach Choi *et al* weiter in den Luminalen und TP53-like-Subtypen unterteilen, der basale Subtyp wird von Choi nicht weiter spezifiziert. Eine weitere Stufe tiefer enthält der Basale Subtyp die TCGA Cluster III und IV, der Luminele das Cluster I und der TP53-like-Subtyp das Cluster II. Hierzu wurde ein Datensatz des TCGA, bestehend aus 234 MIBC-Proben, einem *bootstrap*-hierarchischen Konsens-Clustering unterzogen.

Um die verschiedenen Modelle der Subtypisierung weiter in Einklang zu bringen, fand 2016 ein Konsens-Meeting statt (Lerner *et al.* 2016). In diesem wurde in Übereinstimmung der Basal-squamös-ähnliche-Subtyp, ausgezeichnet durch eine hohe Expression von KRT5/6 und KRT14 sowie durch eine niedrige Expression von GATA3 und FOXA1, definiert. Auch die Existenz einer Gruppe von Tumoren mit urothelialer Differenzierung wurde anerkannt, die molekulare Definition stand aber weiterhin aus.

Sjödahl *et al* veröffentlichte 2017 eine überarbeitete und erweiterte Klassifikation („Lund-Klassifikation“). In dieser kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz: fünf Subtypen wurden auf der Basis von Immunhistochemischen-Färbungen sowie Tumorzellphänotypen und sechs Subtypen bzw. Genexpressionscluster wurden auf der Basis von Genomexpressionsanalysen definiert. Die fünf Tumorzellphänotypen wurden als *urothelial-like*, *genomically unstable*, *basal/SCC-like*, *mesenchymal-like* und *small-cell/neuroendocrine-like* bezeichnet. Den sechs Konsensclustern wurden die Bezeichnungen *urothelial-like* (Uro), *genomically unstable* (GU), *epithelial-infiltrated* (Epi-inf), *squamous cell carcinoma-like/mesenchymal-infiltrated* (SCCL/Mes-Inf), *SCCL/UroB* und *small-cell/neuroendocrine-like* (sc/NE) gegeben. Sjödahl *et al* merkten an, dass eine Kombination beider Methoden für eine adäquate Subtypisierung von MIBC erforderlich ist (Sjödahl *et al.* 2017). 2018 wurde dieses System an einem unabhängigen TCGA Datensatz validiert (Marzouka *et al.* 2018).

Ebenfalls 2017 identifizierten Robertson *et al* fünf Expressionssubtypen durch RNA-Sequenzierungen an 406 MIBC Proben: luminal-papillär, luminal-infiltriert, luminal, basalsquamös und neuronal (Robertson *et al.* 2017). In dieser Publikation wurde zudem erstrebt, mögliche Therapieempfehlungen anhand dieser molekularen Subtypen zu formulieren. Validiert werden konnte diese allerdings nicht.

2019 folgte durch die „The Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group“ eine erneute Bemühung, einen Konsens für die molekularen Subtypen des MIBCs zu erreichen (Kamoun *et al.* 2018). Die sechs veröffentlichten MIBC-Klassifizierungen wurden genutzt, um anhand von 1750 MIBC-Transkriptomen sechs molekulare Klassen zu definieren: *Luminal Papillary*, *Luminal Non-Specified*, *Luminal Unstable*, *Stroma-rich*, *Basal/Squamous* und *Neuroendocrine-like*, bezeichnet als „Baylor-Klassifikation“.

Im gleichen Jahre veröffentlichte Sjödahl *et al* einen Algorithmus für die immunhistochemische Subtypisierung von MIBC, basierend auf den 2017 definierten Subtypen URO, GU, Basal-SCC-like, Mes-like und NE-like (Sjödahl *et al.* 2019). Mit diesem Algorithmus arbeitet auch die hier vorgelegte Arbeit. Die auf Immunhistochemie basierende Subtypisierung stellt eine kostengünstige und schnelle Alternative gegenüber den Transkriptom-Analysen dar, die sich leicht in den klinischen Alltag integrieren lassen könnte.

Es bestehen somit sowohl Übereinstimmungen als auch widersprüchliche Daten bezüglich der Subtypisierung von Urothelkarzinomen der Blase. Die Prognose der unterschiedlichen Typen und die individuelle Therapie dieser mit dem besten Erfolgsversprechen wird weiterhin diskutiert. Um hier zu einem endgültigen Consensus zu gelangen ist es erforderlich, eine große Anzahl an unabhängigen Kohorten mit Daten zum klinischen *Follow up* und zur Subtypisierung bezüglich des Überlebens und des Therapieansprechens zu analysieren. Die Analyse der UKD-hauseigenen Kohorte in diesem Projekt soll zu diesem großen Bestreben beitragen.

1.9. Ziele der Arbeit

Diese Arbeit verfolgte zwei zentrale Ziele. Zum einen sollten neue, möglichst tumorspezifische, Zielmoleküle für eine CAR-T-Zell-Therapie des Urothelkarzinoms identifiziert werden. Hierzu kamen zunächst bioinformatische Techniken zum Einsatz, gefolgt von Analysen an Zelllinien, anschließend auf mRNA-Ebene und schließlich über immunhistochemische Färbungen an manuell erstellten Tissuemicroarrays (TMA) auf Protein-Ebene. Diese TMAs wurden aus Paraffin-Gewebeproben einer eigenen Kohorte von Patienten, die am UKD wegen eines Harnblasenkarzinoms in Behandlung waren, erstellt.

Ein zweites Ziel war, die unter anderem im ersten Teil der Arbeit identifizierten Zielmoleküle hinsichtlich ihrer Eignung als mögliche prädiktiver Biomarker, die das Ansprechen der Patienten auf ihre Therapie vorhersagen könnten, anhand dieser Kohorte zu untersuchen. Konkret wurde zunächst untersucht, ob sich das Therapieansprechen der neoadjuvant-therapierten Patienten mit der Expression verschiedener Marker in Verbindung bringen lässt. Darüber hinaus sollte eine molekulare Charakterisierung der Kohorte, durch Klassifizierung in molekulare Subtypen, Erhebung der Expression von Immuncheckpoint-Proteinen sowie Bestimmung von Proliferationsaktivität und Inflammation über weitere immunhistochemische Färbungen erfolgen, um mögliche Veränderung der Biomarker im Krankheitsverlauf und unter Therapiedruck nachverfolgen zu können.

2. Material und Methode

2.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit bestand aus insgesamt 60 Patienten mit urothelialem Blasenkarzinom, die am Universitäts-Klinikum-Düsseldorf in den Jahren 2004 bis 2021 eine Systemtherapie erhalten haben. Die Patienten wurden über eine Abfrage der Datenbanken der Klinik für Urologie am UKD identifiziert. Daraufhin wurde geprüft, ob Tumorgewebe asserviert wurde. Die Aufklärung über die Asservierung und Verwendung ihres Biomaterials erfolgte mündlich und mittels der Patienteninformation und -aufklärung schriftlich. Bei einigen bereits verstorbenen Patienten ohne Einwilligung wurde der mutmaßliche Patientenwille durch Kontaktaufnahme mit den Angehörigen eruiert, die Daten dieser Patienten werden in einem mit der Ethikkommission abgestimmten Verfahren nach Abschluss der Datenerhebung an der Quelle anonymisiert (Ethikvotum 2020-1232). Zur Probengewinnung fand kein zusätzlicher Eingriff statt, unabhängig davon war bei sämtlichen Patienten die entsprechende Operation klinisch indiziert. Gewebe wurde in Trans-urethralen Resektionen der Blase (TUR-B), Zystektomien und Biopsien von Metastasen oder Lokalrezidiven gesammelt. Von einzelnen Patienten waren konsekutive Proben vor und nach Therapie verfügbar. Die Kohorte lässt sich entsprechend der Behandlung in vier Untergruppen einteilen: 19 Patienten haben Immun-Checkpoint-Inhibitoren, 19 eine neoadjuvante, 26 eine palliative und fünf Patienten eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Einige Patienten sind dabei Teil von mehr als einer dieser Gruppen, haben also z.B. sowohl einen Immun-Checkpoint-Inhibitor als auch palliative Chemotherapie erhalten. Die Ethikkommission des UKD hat diese Studie begutachtet und befürwortet (Ethikvotum 2020-1232), krankheitsrelevante Daten der Patienten werden pseudonymisiert (mit Ausnahme der anonymisierten Daten der verstorbenen Patienten ohne Einwilligung) gespeichert.

2.2. Bezugsquellennachweis

2.2.1. Chemikalien

Agarose

Sigma-Aldrich,

St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

Rotiphorese®50x TAE Puffer

Carl Roth GmbH + Co. KG,

Karlsruhe, Deutschland

Aqua dest.

Fresenius Kabi AG,

Paraffin Pellets (56-58°)	Bad Homburg, Deutschland Engelbrecht – Medizin & Labortechnik GmbH Edermünde, Deutschland
---------------------------	---

2.2.2.Verbrauchsmaterialien

Light Cycler 480 Multiwell Plate 96	Roche AG, Basel, Schweiz
Light Cycler 480 Sealing Foil	Roche AG, Basel, Schweiz
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 2,0 ml, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany
Multipette Combitips advanced	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2.3.Geräte

Vortex Mischer	Labin GesmbH, Dietersdorf, Österreich
Zentrifugen: Centrifuge 5418, mini spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Light-Cycler ®	Roche AG, Basel, Schweiz
Multipette Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Agarosegelkammer; Model: B2, Owl Separation Systems	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

Analysewaage	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Mikrowelle	Küppersbusch Hausgeräte GmbH Gelsenkirchen, Deutschland
Stromquelle	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Jena, Deutschland
Kamera/UV-Licht-Kammer für Agarosegel	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermocycler (TRIO-Thermoblock)	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Jena, Deutschland
Autoklav	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Paraffineinbettungs-Station Pfm 4004	PFM medical AG, Köln, Deutschland
Manual Tissue Arrayer – MTA1	Becher Instruments Inc, genXpress Service & Vertrieb GmbH, Wiener Neudorf, Österreich
Manual Tissue Arrayer Stanzen 1,5mm	Estigen OÜ Tartu, Estonia
Depth Stop Kit DSK-1	Becher Instruments Inc, genXpress Service & Vertrieb GmbH, Wiener Neudorf, Österreich
Brutschrank, Modell 200	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop AXIO Scope.A1	Carl Zeiss Sports Optics GmbH, Wetzlar, Deutschland
Ventana Benchmark XT	Roche AG, Basel, Schweiz
Ventana Benchmark Ultra	Roche AG, Basel, Schweiz
QR-Code Drucker: Ventana Ebar II	Roche AG, Basel, Schweiz
Brutkasten	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
Kühlbank	Miles Scientific Corp. Newark, Delaware, Vereinigte Staaten
Schlitten-Mikrotom HM400	Microm International GmbH Walldorf, Deutschland

Wasserbad für Mikrotom	Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Objektträger	Klinipath BV, Duiven, Niederlande
FISH-Mikroskop (Fotographie) DM550B	TOMO® Matsunami Glass IND LTD, Osaka, Japan
Leica Kübler CODIX	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
LEICA CTR5500	
Kamera: C-MOUNT, KY-F75U, 3-CCD	JVCKENWOOD Deutschland GmbH Bad Vilbel, Deutschland

2.2.4. Software

Microsoft ® Excel ® 365 für Windows	Microsoft Corporation, Redmond (Washington, USA)
IBM SPSS Statistics, Version 27	IBM Corporation, Armonk, New York, Vereinigte Staaten
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Light Cycler ® 96 SW 1.1	Roche AG, Basel, Schweiz
Intas GDS für Windows	Intas Science Imaging Instruments GmbH Göttingen, Deutschland
DISKUS32, 2010	DISKUS Mikroskopische Diskussion Königswinter, Deutschland
Human Protein Atlas proteinatlas.org	
GeneCards - Onlinedatenbank	Weizmann-Institut für Wissenschaften

2.2.5. Antikörper

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Antigen-Demaskierung	Inkubations-dauer (min)	Katalognummer	Hersteller
EpCAM	Ber-EP4	Maus	1:400	Protease	32	M080401-2	Dako
CD4	SP35	Hase	1:100	Hitze	20	CI851C01	DCS
CD8	C8/144B	Maus	1:200	Hitze	32	M710301-2	Dako
CK5	XM26	Maus	1:100	Hitze	28	NCL-L-CK5	Leica
FOXP3	86D	Maus	1:100	Hitze	32	ACI 3197 A, C	Biocare
GATA-3	L50-823	Maus	1:200	Hitze	28	CM 405 B	Biocare
LAG3	CAL26	Hase	1:100	Hitze	32	ACI 3213 A, B	Biocare
Ki67	MIB-1	Maus	1:100	Hitze	24	M724001-2	Dako
P16	JC/2	Maus	1:200	Hitze	28	Mob575	Zytomed
PD-L1	28-8	Hase	1:400	Hitze	28	M365329-2	Abcam
TIGIT	BC41	Maus	1:100	Hitze	32	ACI 3254 A, C	Biocare
PD-1	NAT105	Maus	1:25	Hitze	28	315M-96	Cell Marque
EGFR	2-1E1	Maus	1:100	Protease	32	MSK014-05	Zytomed
CD44v6	VFF-18	Maus	1:1000	Hitze	28	MAB4073	Sigma-Aldrich/Merck
TERT	TERT	Hase	1:50-1:100	Hitze	28	C00169F	Signalway
BIRC5	BIRC5	Hase	1:1000-1:2500	Hitze	28	HPA002830	Sigma-Aldrich/Merck
TROP2	TAC-STD2	Hase	1:500	Hitze	28	HPA055067	Sigma-Aldrich/Merck
NECTIN4	NECTIN4	Hase	1:200	Hitze, 88min	28	MABT64	Sigma-Aldrich/Merck

2.2.6. Primer

Tabelle 5: Verzeichnis der verwendeten Primer (Luna)

Gen	Primer forward (PF)/ Primer reverse (PR)	Annealing Temperatur (Tm °C)	Sequenz (5'-3')
RIMS2	PF	63.0	TTTGGGAGCAAAAGATCTCC
	PR	63.9	TCCATTGGGTTCCAATGTT
RAB26	PF	64.5	ACTTGGCCTTCACAGGCCATA

	PR	63.8	CCTCGACCCTCCCTTTAAC
NPTXR	PF	64.2	CAGAGGCAGGAAGTGGAAAA
	PR	63.8	GCATCTGGAGGACTGTAGGC
FAM129A	PF	63.9	GGAACGATCCGTTCTGACAT
	PR	63.5	TCTCCAAGCAGCTTTCTCC
FAM129B	PF	64.0	TGGACCAAATTATCACCTCCA
	PR	64.1	CCAGGATGGATGGGATGTAG
PTPRN	PF	64.9	GATTGTCCTGGCACGATGA
	PR	65.0	GCAGGACCAAGGTCTCTGG
DLL3	PF	64.5	ACCGGTCTACACCGAGCA
	PR	63.9	CCAGGTTTCGATGATGAAAGA
MAGEA1	PF	64.4	CCTCCTCCTCCTCTCCTCTG
	PR	64.2	TCTGGGGAGGGATCTGTTGAC
RAPSN	PF	63.9	CGCTACAAGGAGATGCTGAAG
	PR	63.9	TGCCAGGTTCAGGTAGCTCT
TERT	PF	64.4	ATGTCACGGAGACCACGTTT
	PR	64.6	CTGCACCCCTTTCAAGTGCT
ALPP	PF	63.9	GGTGAACCGCAACTGGTACT
	PR	64.4	CATGTACTTTCGGCCTCCAC
ADAM22	PF	64.1	AGGTGTCTTCCTGTGGCTTCT
	PR	63.9	TGCAATCAGAACCTATCCAGTG
TROP2	PF	64.1	ACCTCCAAGTGTCTGCTGCT
	PR	64.1	GTCGTAGAGGCCATCGTTGT
NECTIN4	PF	64.0	CTGCCATGTCAGCAATGAGT
	PR	63.7	CACTAGGTCCACCTGCTTCC
TBP	PF	62.0	GAGCCAAGAGTGAAGAACAGTC
	PR	66.1	GCTCCCCACCATATTCTGAATCT
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten			

Tabelle 6: *Übersicht über die verwendeten Primer (SYBR-Green)*

Gen	Sequenz/		Tm °C	Hersteller
MAGEA1	QuantiTect® Primer Assay QT00012320		/	Qiagen N.V. Hilden, Düsseldorf
BIRC5	PF	AGGACCACCGCATCTCTACAT	64.7	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
	PR	AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	63.6	

2.2.7. Substanzen für Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR

Tabelle 7: Substanzen für Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR

Luna® Universal qPCR Master Mix	New England BioLabs Inc. Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten
SYBR® Green Master Mix	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
GelRed® Prestain Plus 6X DNA Loading Dye	Biotium Fremont, Vereinigte Staaten
O'GeneRuler DNA-Leiter-Mix, gebrauchsfertig, 100–10.000 bp	
dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Oligo(dT)18 Primer (0.2µg/µl)	
Random Hexamer Primer (0.2 µg/µl)	
RT-Buffer (5x)	
Maxima H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µl)	
RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)	

2.2.8. Substanzen für Immunhistochemie

Tabelle 7: Substanzen für Immunhistochemie

Ventana EZ Prep	
Ventana Ultra LCS	
Ventana SSC	
Ventana Reaction Buffer	
Ventana Ultra CC1/2	
Ventana SISH	
Ventana Option	
Protease 1	Roche AG, Basel, Schweiz
Bluing Reagent	
View Universal DAB-Inhibitor	
View Universal HRP Multimer	

View Universal DAB Chromogen	
View Universal DAB H2O2	
View Universal DAB Copper	
OptiView DAB IHC Detection Kit	
UltraView DAB IHC Detection Kit	
Antikörper Verdünnungspuffer	Zytomed Systems GmbH Bargteheide, Deutschland

2.2.9. Zelllinien

In dieser Publikation wurden überwiegend kommerziell erhältliche, maligne sowie benigne Zelllinien verwendet. Eine genaue Aufzählung inklusive pTNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad, Herkunftsgewebe und Referenz wird in der folgenden Tabelle bereitgestellt.

Tabelle 8: verwendete Zelllinien

	Geschlecht	pTNM	Grad	Alter [Jahre]	Herkunft	Referenz (PMID)
Kommerzielle maligne						
BFTC-905	F	Ta	G3			(Tzeng <i>et al.</i> 1996)
RT-112	F	Ta	G2		UCC	(Marshall <i>et al.</i> 1977)
SW-1710	F	Ta	G1	84	UCC	(Kyriazis <i>et al.</i> 1984)
UM-UC-6	M		G3		TUR-B, UCC	(Grossman <i>et al.</i> 1986)
RT-4	M	T1	G1-2	63	Papilläre Rekurrenz, UCC	(Rigby und Franks 1970)
647v	M	T1/T2/3a	G2	59		(Elliott <i>et al.</i> 1977)
VM-CUB1	M		G2		EC	(Williams 1980)

UM-UC-3	M		G3		UCC	(Grossman <i>et al.</i> 1986)
253J	M	T4	G4	53	LK-Metastase, UCC	(Elliott <i>et al.</i> 1974)
HT-1376	F	$\geq T2$	G3	58	UCC	(Rasheed <i>et al.</i> 1977)
5637	M		G2	68		(Fogh <i>et al.</i> 1977)
T-24	F	Ta	G3	81	EC	(Bubeník <i>et al.</i> 1973)
J82	M	T3	G3			(O'Toole <i>et al.</i> 1978)
639v	M		G3	69	UCC	(Elliott <i>et al.</i> 1977)
Scaber	M				SCC (squamös)	(O'Toole <i>et al.</i> 1976)
benigne						
HBLAK					Käufliche Zelllinie Fi. CellnTec, aus Ureter etabliert, spontan immortalisiert	(Hoffmann <i>et al.</i> 2016)
TERT-NHUC					In der AG Knowles aus Ureter etabliert und TERT immortalisiert; weltweit zur Verfügung gestellt	(Chapman <i>et al.</i> 2006)
UP146					Primäre Zellkultur UKD,	/

					s. Kommentar unten	
UP152						/
UP249						/
UP248						/
UP263						/
PREC					Käufliche Prostata-Epithel-Zellen	(Sobel <i>et al.</i> 2006)
PBMCs					mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	/
Fibroblasten					Fibroblasten	/

Die Primär-Zelllinien UP146, UP 152, UP249, UP 248 und UP263 wurden vor 2016 aus Material von Patienten der urologischen Klinik des Universitäts-Klinikum-Düsseldorf pseudonymisiert etabliert und zur Extraktion von RNA aufgebraucht. Diese RNA wurde der Doktorandin zur Verfügung gestellt, die klinischen Daten dieser Patienten sind für die Doktorandin nicht bekannt oder rückverfolgbar (Studiennummer 1788). Die RNA aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes stammt von einem gesunden, freiwilligen Spender. Die RNA von Fibroblasten stammt aus einer Primärkultur von Vorhautfibroblasten, die in der hiesigen Hautklinik in der zweiten Hälfte der 1990er Jahre bei Entfernung der Vorhaut aus medizinischen Gründen angelegt wurden. Weitere Angaben zu den Spendern sind uns nicht übermittelt worden (Studiennummer 2018-254).

Tabelle 9: RNA extrahiert aus tumorösem und gesundem Blasengewebe

mRNA, extrahiert aus Blasengewebe	
Tumor	Gesunde Blasen
BT41	BN273
BT105	BN276
BT120	BN274
BT12	BN363

BT115	BN357
BT28	BN371
BT62	BN365
BT111	BN374
BT6	BN373
BT55	BN369
BT322	
BT364	

Die in Tabelle 9 aufgeführten RNA-Extrakte wurden aus Urothelkarzinom (BT) und normalem Blasengewebe (BN) extrahiert, diese wurden aus der Gewebebank der Urologischen Klinik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf abgefragt (Studiennummer 3836). Auch die klinischen Daten dieser Patienten sind für die Doktorandin nicht bekannt oder rückverfolgbar.

2.2. Biochemische Untersuchungen auf RNA Ebene

2.2.1. Reverse Transkription für semi-quantitative Real-Time PCR

Für die Umschreibung von einzelsträngiger RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde folgendes Protokoll von Thermo Fischer Scientific verwendet:

Für die Primer Hybridisierung wurde jeweils 1 µg RNA mit dest. Wasser zu 12,5 µl aufgefüllt. Jeder der Proben wurde dann der in der folgenden Tabelle aufgeführte Mastermix beigelegt.

Tabelle 10: Master Mix 1 für Reverse Transkription

Komponente	Volumen (µl)
dNTP-Mix (10 mM)	1
Oligo(dT)₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	0.25
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)	0.75
Gesamt	2

Darauf folgte eine 5-minütige Behandlung bei 65° im Thermocycler (Zyklus 1, siehe Tabelle 12), anschließend wurden die Proben vorsichtig zentrifugiert und der zweite Mastermix hinzugefügt:

Tabelle 11: Master Mix 2 für Reverse Transkription

Komponente	Volumen (μ l)
RT-Buffer (5x)	4
Maxima H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5
Gesamt	5.5

Das weitere Temperaturprogramm des Thermocyclers wurde wie folgt eingestellt:

Tabelle 12: Zyklen/Temperaturprogramm für die Reverse Transkription

Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit (Min)
1	65	5
2	25	10
3	50	30
4	85	5
5	4	∞

Folgend wurde die cDNA in einer 1:20 Verdünnung angesetzt und bei -20°C gelagert.

2.2.2. Quantitative Real-Time PCR

Zur Messung der Genexpression wurden farbstoffbasierte Quantitative Real-Time PCRs mit Gen-spezifischen Primern durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte hier über die Erfassung von Fluoreszenzsignalen, diese waren proportional zu der pro PCR-Zyklus vorhandenen dsDNA. Anschließend wurden diese mit der Konzentration des gewählten *housekeeping*-Gens TBP in Relation gebracht. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen. Mit Hilfe der Erstellung von Schmelzkurven und der Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese wurde die Spezifität der Reaktion überprüft.

Tabelle 13: Reaktionsmix für Agarose-Gelelektrophorese

	Komponente	Volumen/Menge
Agarose-Gel	Agarose	2,5 g
	Rotiphorese®50x TAE Puffer	100 ml

DNA-Marker	O'GeneRuler DNA-Leiter-Mix, gebrauchsfertig, 100–10.000 bp	2 µl
	Dest. H2O	3 µl
Probe	cDNA (1:20 verdünnt)	5 µl
	GelRed® Prestain Plus 6X DNA Loading Dye	1 µl

Tabelle 14: *Reaktionsmix für quantitative Real-Time PCR*

Komponente	Volumen (µl)
Luna® Universal qPCR Master Mix/SYBR® Green Mastermix	10
Template DNA (1:20 Verdünnung)	2
Forward Primer (10 µM)	0,5
Reverse Primer (10 µM)	0,5
Aqua dest.	7
Gesamt	20

Je nach Kompatibilität der Primer wurde der Luna® Universal qPCR Master Mix oder der SYBR® Green Mastermix verwendet und der LightCycler® entsprechend programmiert.

Tabelle 15: *Programm für quantitative Real-Time PCR im Light Cycler ® 96 SW 1.1 (Luna®)*

Programmablauf	Preincubation	2 Step Amplification		Melting			Cooling
Zyklen	1	40		1			1
Temperatur	95°	95°	60°	95°	55°	97°	37°
Zeit	60s	15s	30s	10s	60s	1s	30s

Tabelle 16: *Programm für quantitative Real-Time PCR im Light Cycler ® 96 SW 1.1 (SYBR-Green®)*

Programmablauf	Preincubation	3 Step Amplification			Melting			Cooling
Zyklen	1	45			1			1
Temperatur	95°	95°	55°	72°	95°	55°	97°	37°
Zeit	900s	15s	30s	20s	10s	60s	1s	30s

2.3 *Tissue microarrays*

Bei Gewebemikroarrays handelt es sich um Paraffinblöcke, in denen multiple Gewebsstanzen, oder auch so genannte „Cores“, eingebettet sind. Dadurch wird eine simultane Analyse zahlreicher Proben an nur einem histologischen Objektträger ermöglicht. In unserer Studie erfolgte die Erstellung der TMAs mit den Patientenproben unserer Kohorte manuell mit Hilfe eines Manual Tissue Arrayers (Becher Instruments Inc, genXpress Service & Vertrieb GmbH). Die vorherige Markierung geeigneter Areale erfolgte anhand der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte in Zusammenarbeit mit der Pathologie. Ausgewählt wurde ein Core-Durchmesser von 1,5 mm, in unserem Fall konnte eine TMA dadurch maximal 48 unterschiedliche Proben enthalten. Die Core-Tiefe beträgt 3 mm. Je sechs dieser Proben dienten als Negativ- Kontrollen: zwei Cores enthielten gesunde Lymphknoten-Pulpa und vier Cores so genanntes „*matched tissue*“. Für dieses haben wir nicht kanzerös befallenes Hamblasengewebe zweier Patienten aus unserer Kohorte verwendet. Für jeden Eingriff waren in unseren TMAs zwei Cores vorgesehen. Die maximale Anzahl an Cores pro Patienten beträgt, bei drei Eingriffen, also sechs. Bei einigen Patienten lag uns nur spärliches Tumorgewebe aus einem Eingriff vor, in diesen Fällen hat es nur für einen Core gereicht.

Um das Gewebe der *cores* weiterhin zu den klinischen Daten des jeweiligen Patienten verknüpfen zu können, wurde eine Karte erstellt, die die genaue Position jedes *cores* angab. Die Negativ-Kontrollen dienten hier als Landmarken zur Orientierung.

Nach dem Stanzen der TMAs wurden diese für 20-30 Minuten in einem auf 60° erhitzten Brutschrank aufbewahrt. Nach dem vollständigen Auskühlen der Blöcke erfolgte das Erstellen der 2-3 µm dicken Schnitte. Die Leerschnitte wurden daraufhin über Nacht im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Nach einer weiteren Lagerung bei 60° für eine Stunde erfolgte die Färbung der Schnitte.

2.4 Immunhistochemische Färbung und Auswertung

Immunhistochemische Färbungen machen es möglich, die Expression bestimmter Antigene im Gewebe über eine farbliche Darstellung nachzuweisen. In dieser Studie wurden die insgesamt 17 Färbungen mittels des Ventana Benchmark XT und des Ventana Benchmark Ultra Systems (Roche AG, Basel, Schweiz) durchgeführt. Je nach Fragestellung unterscheiden diese sich in ihrer Auswertung.

Die spezifischen Antikörper-Klone, die Spezies, Verdünnung, Methode der Antigen-Demaskierung und jeweilige Inkubationsdauer sowie die Hersteller sind in Tabelle 4 „Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper“ (siehe Seite 19) aufgeführt.

Für GATA3, CK5, p16 und EpCAM erfolgte die Auswertung rein nach einem positiv/negativ-Kriterium. Lag die Positivität im jeweiligen Core nicht gleichmäßig, sondern nur fokal vor, wurde dies mit einer Prozentangabe der positiven Zellen vermerkt. Gleiches Kriterium galt für PD-1, hier wurde eine Probe als positiv angesehen, wenn 1% der Zellen eine starke oder 10% der Zellen eine schwache Färbung aufwiesen (analog zu (Sharma *et al.* 2019)).

Die PD-L1 Auswertung erfolgte anhand der aktuell praxisrelevanten Scoring-Systeme: dem IC und CPS. Der IC, „*Immune Cell Score*“, errechnet sich aus dem Quotienten des prozentualen Flächenanteils der PD-L1 positiven Zellen (hierbei zählen Lymphozyten, Makrophagen und Tumorzellen) und der Anzahl aller vitalen Tumorzellen. Dieses Ergebnis wird zuletzt mit dem Faktor 100 multipliziert und als Prozentzahl angegeben. Den CPS, „*combined positivity score*“, erhält man, indem die Anzahl der PD-L1 gefärbten Zellen durch die Gesamtzahl der vitalen Tumorzellen geteilt und ebenfalls mit 100 multipliziert wird (u.a. Übersicht in (Eckstein *et al.* 2019)).

Da für die Auswertung der Lymphatischen Marker CD4, CD8, FOXP3, LAG3 und TIGIT keine Blasentumor Publikation vorliegt, wurde diese analog zur klinischen Routine des Instituts der Pathologie durchgeführt: die stromalen und intratumoralen Lymphozyten wurden separat betrachtet. Zunächst wurde vermerkt, ob diese überhaupt im jeweiligen Kompartiment vorhanden waren, dann wurde die grobe Anzahl der gesamten Lymphozyten geschätzt. Für die fünf Antigene wurde dann der positive Prozentsatz in Relation zur gesamten Zellzahl angegeben.

Da der Marker Ki67 (MIB-1) ein Maß für die Proliferation darstellt, wurde hier die Anzahl der exprimierenden Tumorzellen in Prozent angegeben.

Für die Gene EGFR, CD44v6, TROP2 und NECTIN4 erfolgte die Auswertung auf einer Skala von 0-3+, je nach Intensität der entstandenen Färbung. Im Fall von EGFR repräsentiert die Zahl 0 eine nicht vorliegende Färbung oder nur in einem Anteil von <10% der Tumorzellen an, 1+ eine unvollständige membranäre Färbung in >10% der Tumorzellen, 2+ eine schwache, aber vollständige und durchgängige Färbung in >10% der Zellen und 3+ eine starke Färbung in mehr als 10% der Zellen an (analog (Hwangbo *et al.* 2013))).

Im Falle von CD44v6 wurde die Intensität der Färbung und der Anteil der gefärbten Tumorzellen getrennt bewertet. Die Intensität erhielt je nach Färbung eine Punktzahl zwischen 0 und 3+. Null zeigte dabei eine negative, 1+ eine schwache, 2+ eine moderate und 3+ eine starke Färbung an. Auch der Anteil der gefärbten Tumorzellen wurde zunächst durch eine Punktzahl angegeben, waren <25% der Tumorzellen gefärbt erhielt dieser Core eine 0, bei 26-50% eine 1, bei 51-75% eine 2 und bei >75% einen Score von 3. Diese beiden Scores wurden dann miteinander multipliziert, ein Wert zwischen 1 und 4 zeigt eine schwache CD44v6 Expression, ein Wert

zwischen 5 und 8 eine moderate und ein Score zwischen 9 und 12 eine hohe CD44v6 Expression an (analog durchgeführt zu (Thanan *et al.* 2012)).

Die Auswertung von TROP2 orientierte sich an einer Publikation von Bardia *et al.* Die TROP2 Expression wurde hier über einen so genannten „H-Score“ (Histochemical Score) berechnet: H-Score = 3(% stark gefärbte Zellen) + 2(% moderat gefärbte Zellen) + 1(% schwach gefärbte Zellen). Auch dieser Score berücksichtigt somit sowohl die Intensität als auch die Anzahl der gefärbten Zellen. Lag der H-Score zwischen 0 und 100 wurde dies von Bardia *et al* als eine niedrige TROP2 Expression klassifiziert. Lag er zwischen 101 und 200 als eine moderate, und bei einem Score von 201-300 als eine starke Expression (Bardia *et al.* 2021). Um unsere Fragestellung nach der Tumorselektivität von TROP2 besser beantworten zu können, wurde eine vierte Kategorie hinzugefügt: die vollständig negativen Proben. In dieser Studie wurden somit alle Proben mit einem H-Score von 1-100 als eine niedrige Expression eingestuft.

Die Auswertungsmethode der NECTIN4 Färbungen erfolgte ebenfalls nach dem H-Score, wieder definiert als die Summe der Intensität der Färbung auf einer Skala von 0-3 und dem Prozentsatz der Zellen, die dieser Intensität entsprachen. Die Unterteilung in ein negatives oder schwach, moderat oder stark positives Ergebnis orientierte sich hier aber an einer Publikation von Pia M. Challita-Eid *et al.*: ein H-Score zwischen 0-14 wurde als negativ angesehen, ein Score zwischen 15-99 als schwach, zwischen 100-199 als moderat und zwischen 200-300 als stark positiv eingestuft (Challita-Eid *et al.* 2016).

Da bei erster Betrachtung die nukleäre und cytoplasmatische Expression von TERT deutliche Unterschiede aufwies, wurden diese beiden Kompartimente getrennt betrachtet und ausgewertet, die Auswertung erfolgt hier analog zu einer Publikation von Potharaju M *et al.* Bestimmt wurde ein „immunoreactivity score“ (IRS), in welchen erneut sowohl die Intensität als auch der Prozentsatz der gefärbten Zellen einfloss. Die Intensität wurde auf einer Skala von 0-3 als negativ, schwach, mäßig oder stark eingestuft. Die Färbung wurde mit 1 bepunktet, wenn $\leq 10\%$ der Zellen positiv waren, mit 2, wenn 10-50% gefärbt waren und mit 3, wenn $\geq 50\%$ der Zellen eine Färbung aufwiesen. Die Summe dieser beiden Werte stellt dann den IRS dar, dieser gilt bei einem Score von 0 als negativ, bei einem Score zwischen 1-6 als schwach und bei einem Score von >6 als stark positiv (Potharaju *et al.* 2019).

Exemplarische Abbildung zum Färbeverhalten von EGFR, CD44v6, TROP2, NECTIN4 und TERT sind im Abschnitt „3.5. Validierung von Kandidaten mittels Immunhistochemischer Färbung eines Tissuemicroarrays“ des Ergebnis-Teils vorzufinden (Abbildung 24-28).

Leider konnte mit dem Antikörper für BIRC5 keine zufriedenstellende Färbung erzielt werden, so dass dieser Marker ausgeschlossen werden musste.

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mittels der Programme SPPS und GraphPad PRSIM. Je nach Fragestellung fand ein Mittelwerts-Vergleich verschiedener Untergruppen statt. Hierzu wurde bei nicht-gegebener-Normalverteilung ein Whitney-U-Test und bei vorliegender Normalverteilung ein Student-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Analyse von Überlebensunterschieden in verschiedenen Gruppen wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellt, die statistische Signifikanz wurde hier mittels eines Log-Rank-Tests ermittelt. Endpunkt war hier das Versterben des Patienten. Die Konfidenzintervalle für das mediane Überleben und *Follow up* wurden durch die Methode von Brookmeyer and Crowley ermittelt (Barker 2009). Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und in den entsprechenden Abbildungen dargestellt.

2.6 Molekulare Subtypisierung

Eine Unterteilung der Kohorte in molekulare Subtypen wurde anhand einer Publikation von Sjödahl *et al* aus dem Jahre 2019 vorgenommen. In dem hier vorgeschlagenen Algorithmus zur immunhistochemischen Subtypisierung von muskelinvasivem Blasenkrebs werden fünf Typen beschrieben: *urothelial-like* (URO), *genomically unstable* (GU), *basal/SCC-like*, *mesenchymal-like* (Mes-like) und *small-cell/neuroendocrine-like* (NE). Der URO- und GU-Subtyp stellen dabei die Luminale Subtypen dar (Sjödahl *et al.* 2019).

Der Algorithmus der Subtypisierung ist im folgenden Ergebnis-Teil in 3.6.1. „Molekulare Subtypen“ dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. In silico Analysen zur Identifikation neuer Kandidaten für Antitumorthерapien

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue mögliche Angriffsziele für eine CAR-T-Zell Therapie von Urothelkarzinomen zu finden. Gesucht waren Gene, die möglichst spezifisch in Urothelkarzinomen exprimiert sind und keine weitläufige Expression im normalen Urothel oder anderen Geweben aufweisen. Die besten Kandidaten sollten in einem zweiten Schritt mittels immunhistochemischer Färbung von Patientengeweben auf einem Tissuemicroarray (TMA) validiert werden. Eine erste Auswahl von Kandidaten ergab sich aus dem Vergleich von Transkriptomdaten der kommerziell erhältlichen Kontrollzelllinie HBLAK und fünf Urothelkarzinom-Zelllinien: RT112, J82, T24, VMCUB1 und UMUC3. Eine entsprechende Auswertung von Daten aus RNA-Sequenzierungen ergab 200 differentiell exprimierte Gene mit einer höheren Expression in den Tumorzelllinien im Vergleich zu HBLAK. Um diese Zahl zu reduzieren, wurde die intrazelluläre Lokalisation der korrespondierenden Proteine geprüft und die Auswahl auf Plasmamembranständige beschränkt. Hierzu wurden die öffentlichen Datenbanken *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) und Genecards (<https://www.genecards.org/>) verwendet. Nach zusätzlicher Berücksichtigung der Funktion dieser Faktoren sind sechs Kandidaten ermittelt worden: *RIMS2*, *RAB26*, *NPTXR*, *FAM129A*, *FAM129B* und *ADAM22*.

Weitere Kandidaten wurden nach in silico Analyse von öffentlich zugänglichen Daten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) identifiziert. Hier wurden zunächst die Transkriptomdaten von 408 Tumorgeweben von Patienten mit Urothelkarzinomen mit wenigen Normalgeweben verglichen. Das weitere Vorgehen verlief analog zur ersten Auswahl. Auch hier wurden sechs mögliche Kandidaten ausgewählt: *PTPRN*, *DLL3*, *MAGEA1*, *RAPSN*, *TERT* und *ALPP*.

Abbildung 1 zeigt eine weitere Übersicht zu dem beschriebenen Vorgehen.

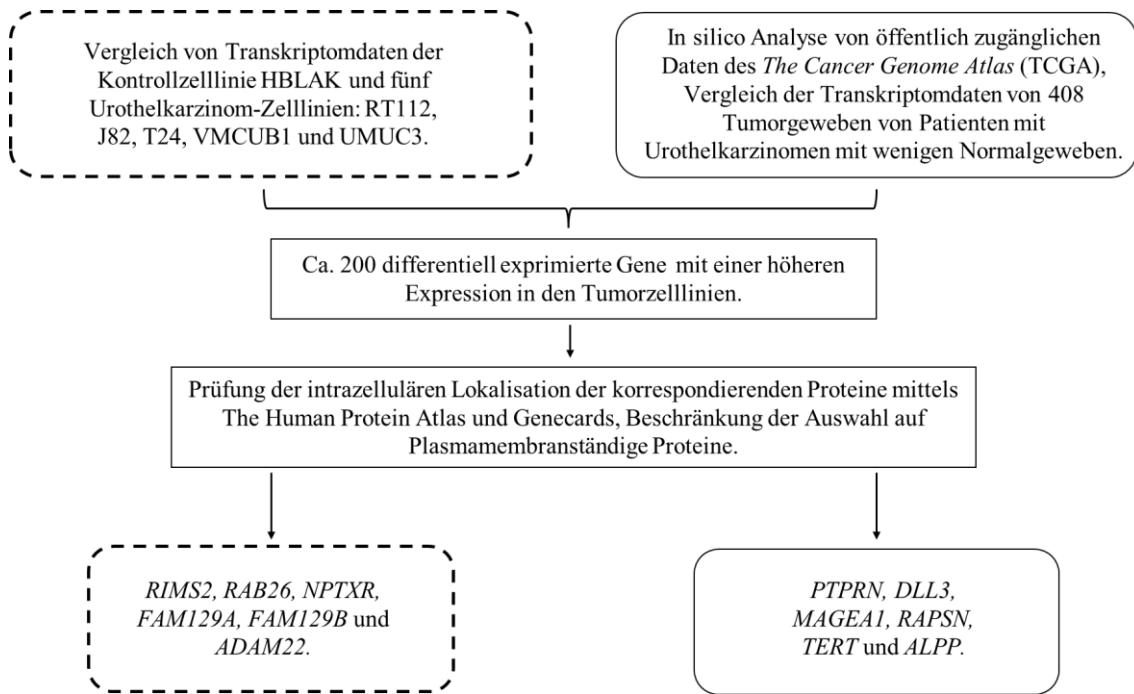


Abbildung 1: Flowchart zu dem Vorgehen bei den in silico Analysen zur Identifikation möglicher Kandidaten für eine Antitumortherapie.

Abseits der bioinformatisch identifizierten Marker sind auch weitere Kandidaten in diesem Projekt als potenzielle neue *Targets* einer CAR-T-Zelltherapie genauer untersucht worden:

Da sich ein weiteres Forschungsprojekt der Arbeitsgruppe mit der Apoptoseresistenz von Urothelkarzinomzellen beschäftigt und einige Apoptosegene in Tumorzelllinien stärker exprimiert waren als in normalen Kontrollzellen wurde die Genexpression der anti-apoptotischen Faktoren BIRC5 und BCL2 gemessen.

Klinisches Interesse bestand bei dem Expressionsmuster von NECTIN4 und TROP2. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, die sich gegen diese beiden Moleküle richten, sind bereits für die klinische Anwendung zugelassen.

In einer Publikation von Grunewald *et al* aus der Arbeitsgruppe wurden CAR-T-Zellen, die sich gegen die Antigene EGFR und CD44v6 richteten, mit Harnblasenkarzinom-Zelllinien, die zuvor entweder mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor (DNMTi) Decitabin oder dem Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) Romidepsin behandelt wurden, ko-inkubiert und anschließend eine Zytotoxizitätsanalyse vorgenommen (Grunewald *et al.* 2021). Die Messungen ergaben, dass eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit Decitabin die Effizienz der CAR-T-Zellen bei der Zerstörung der Tumorzellen verbessert. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Tumorspezifität dieser beiden Zielproteine an den TMAs in Patientengeweben untersucht werden. Expressionsdaten im Zellmodell lagen hier bereits vor.

3.2. In vitro Validierung der Kandidaten an Zelllinien

Die Expression der möglichen Angriffsziele für neue CAR-T-Zell-Therapien des Urothelkarzinoms wurde für Tumorzelllinien und normale Kontrollzelllinien mittels quantitativer real time RT-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Insgesamt wurde die Genexpression in 23 Zelllinien analysiert, 15 davon waren Urothelkarzinomzelllinien, sieben waren Kulturen normaler uroepithelialer Zellen (HBLAK, TERT-NHUC, UPs) sowie eine Kultur normaler Prostataepithelzellen (PREC) (siehe Seite 22, Tabelle 8). In einigen Experimenten wurden noch RNA-Kontrollen aus zwei weiteren Normalzelllinien hinzugefügt: RNA aus PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell), isoliert aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes, und aus einer Fibroblasten-Zelllinie. Für die Gene, für die eine erhöhte Expression über Tumorzelllinien hinweg im Vergleich zu Normalkontrollen nachgewiesen wurde, wurde anschließend die Expression an RNA aus Patientengewebe gemessen.

Zunächst wurde die Expression von den Genen gemessen, die aus dem Transkriptomvergleich der Zelllinien identifiziert wurden: *RIMS2*, *RAB26*, *NPTXR*, *FAM129A*, *FAM129B* und *ADAM22*. *RAB26* entfiel als Kandidat bereits bei der PCR-Etablierung, da in den hier gewählten Urothelkarzinom-Zelllinien eine sehr geringe relative Expression vorlag. Nach weiterer Begutachtung der mittleren relativen Expression zeigten *ADAM22* und *FAM129A* die vielversprechendsten Ergebnisse, also eine durchschnittlich höhere Expression in den Tumorzelllinien im Vergleich zu den Normalkontrollen. *RIMS2*, *NPTXR* und *FAM129B* wiesen diese Verteilung nicht auf und wurden daher nicht weiter als Kandidaten verfolgt. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind im Folgenden graphisch dargestellt:

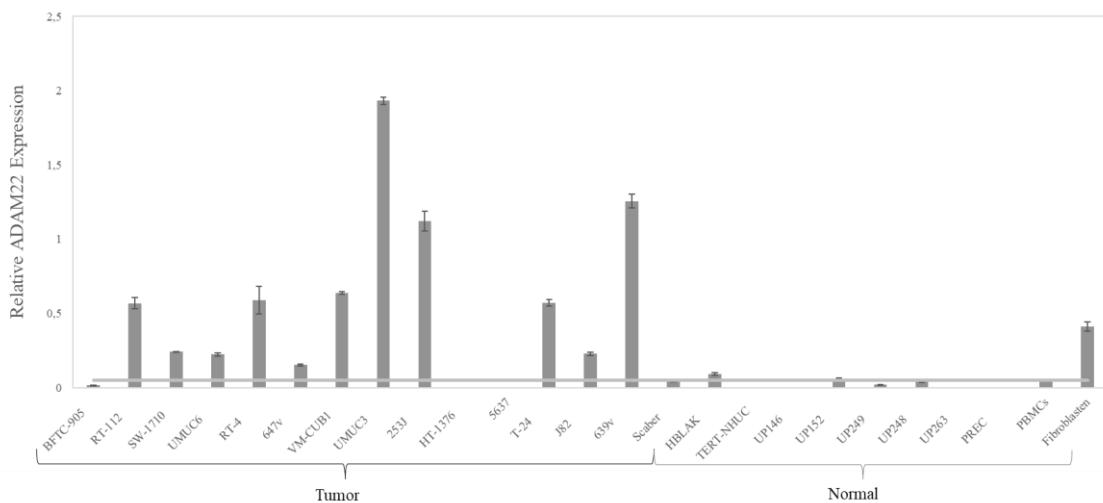


Abbildung 2: Relative ADAM22 Expression in Zelllinien. Die Expression von *ADAM22* wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens *TBP* gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

ADAM22 zeigte in nahezu allen Tumorzelllinien, abgesehen von BFTC-905, HT-1376 und 5637, eine Expression weit oberhalb der mittleren Expression in den Normalkontrollen. In den Normalkontrollen lag die Expression im Durchschnitt weit unterhalb der der Tumorzelllinien, abgesehen von einem Ausreißer, der Expression in der Fibroblasten-Zelllinie. *ADAM22* zeigte sich also als ein chancenreicher Kandidat.

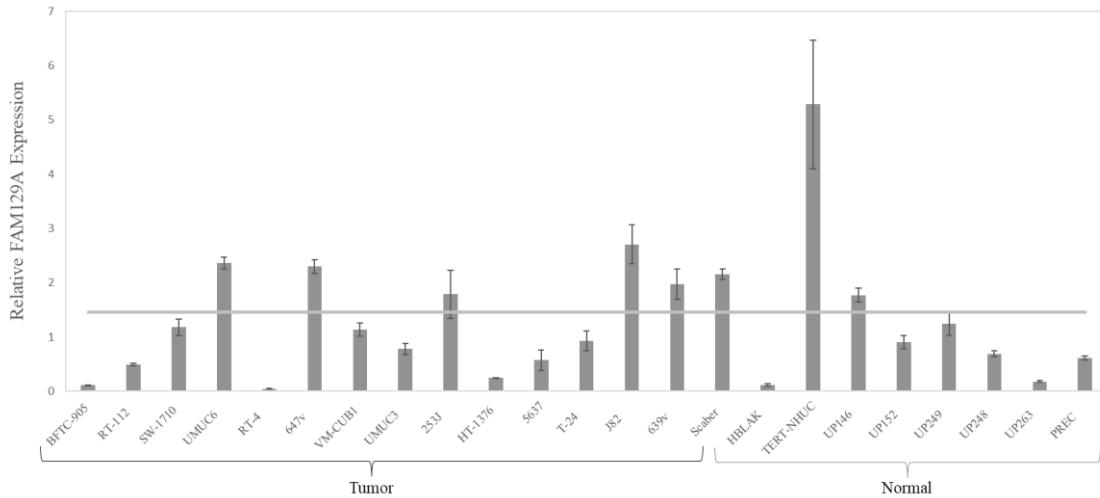


Abbildung 3: **Relative FAM129A Expression in Zelllinien.** Die Expression von *FAM129A* wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens *TBP* gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

Bei *FAM129A* lag diese Differenz nicht so ausgeprägt vor, etwas weniger als die Hälfte der Zelllinien hatten eine Expression oberhalb dem Mittel in den Normalkontrollen. Da die mittlere Expression in den Normalkontrollen durch die deutlich hohe Expression in einer der Normalkontrollen-Zelllinie, und zwar TERT-NHUC, angehoben wurde, haben wir beschlossen, die Expression des Gens weiter in der aus Patientengewebe isolierten RNA zu untersuchen.

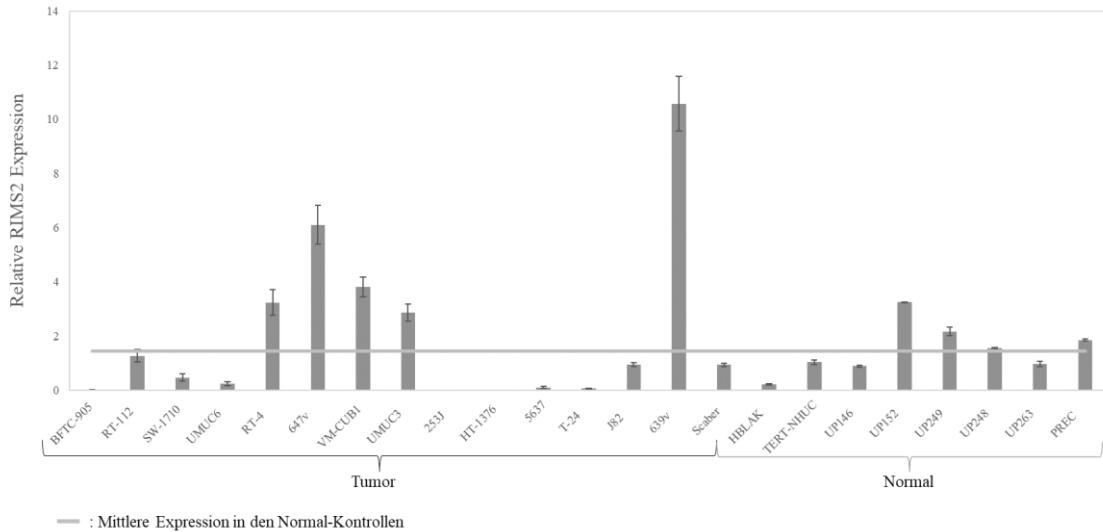


Abbildung 4: Relative RIMS2 Genexpression in Zelllinien. Die Expression von RIMS2 wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

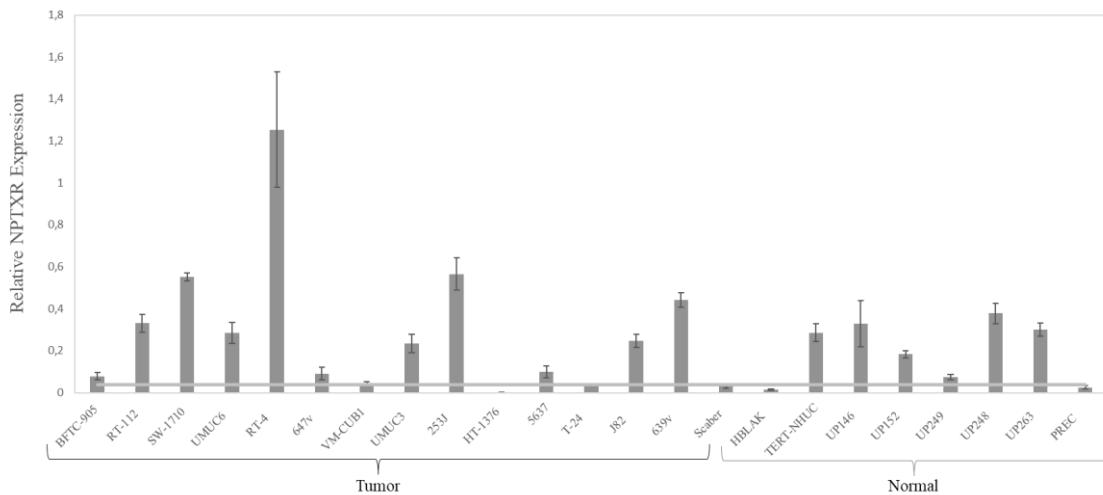


Abbildung 5: Relative NPTXR Expression in Zelllinien. Die Expression von NPTXR wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

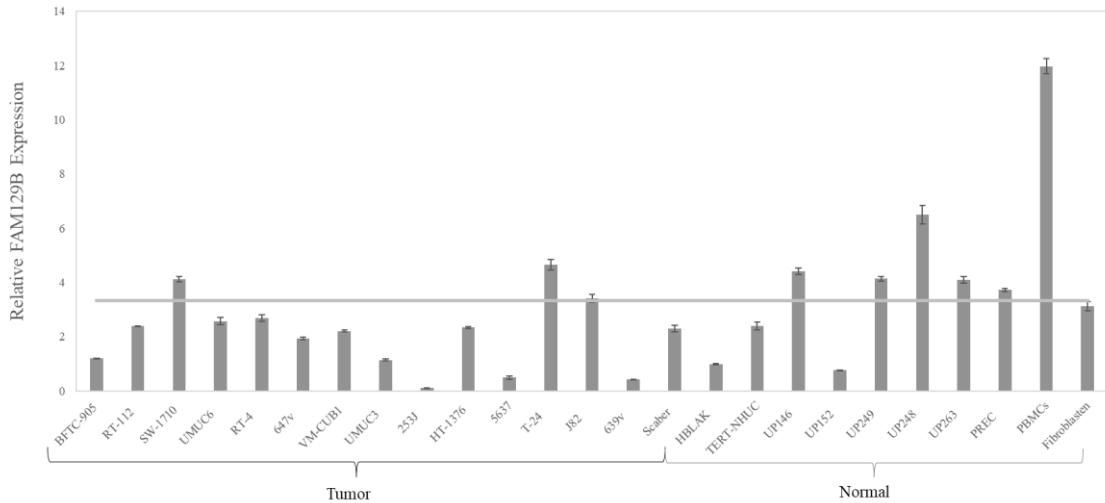


Abbildung 6: Relative FAM129B Expression in Zelllinien. Die Expression von FAM129B wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

RIMS2, NPTXR und FAM129B waren nicht weiter interessant, da die Expression in vielen Normal-Kontrollen der in den Tumorzelllinien ähnelte. Die gewünschte höhere Expression im Tumorgewebe und eine idealerweise nicht vorhandene oder niedrige Expression in den Normalkontrollen war also nicht gegeben.

Bei den sechs Genen, die aus der Analyse der TCGA-Daten gewonnenen wurden, wiesen drei, PTPRN, DLL3 und RAPSN, bereits bei der Etablierung der Primer eine sehr geringe Expression auf. Auch bei der Verwendung von verschiedenen als Positiv-Kontrollen fungierenden Zelllinien unterschiedlicher Zelltypen konnte nur eine sehr geringe Expression detektiert werden. Diese drei Gene wurden somit nicht weiterverfolgt. Im Rahmen der qRT-PCRs zeigte TERT das vielversprechendste Ergebnis, nahezu alle Normalkontrollen wiesen keine Expression auf (Abb. 7). MAGEA1 und ALPP waren zwar teilweise stark exprimiert, aber nur in wenigen Zelllinien

(Abb. 8 und Abb. 9). Letztendlich wurde von diesen beiden Kandidaten nur *ALPP* zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

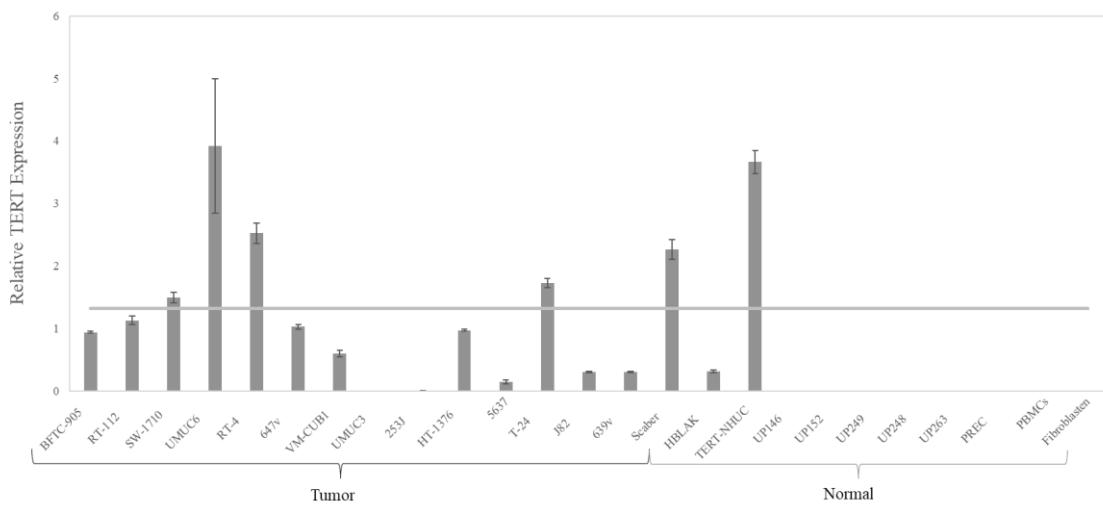


Abbildung 7: **Relative TERT Expression in Zelllinien.** Die Expression von TERT wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

TERT zeigte das gesuchte Expressionsmuster, wies also in der Mehrzahl der Tumorzelllinien eine höhere Expression als in den Normalkontrollen auf. *TERT* zeigte sich somit auch als vielversprechender Marker und wurde weiter analysiert.

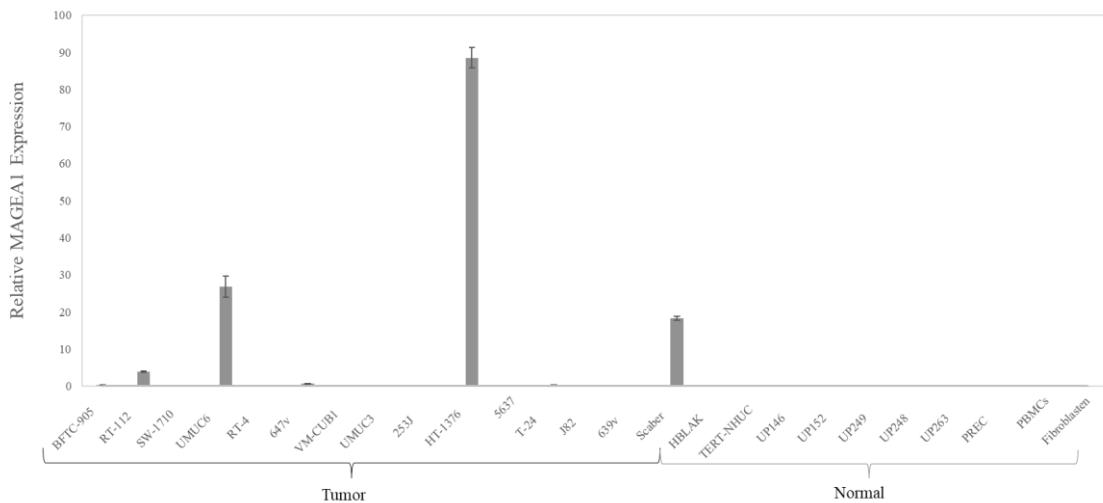


Abbildung 8: **Relative MAGEA1 Expression in Zelllinien.** Die Expression von MAGEA1 wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

MAGEA1 wies wie oben bereits erwähnt in wenigen der Tumorzelllinien eine hohe und keine Expression in den Normalkontrollen auf.

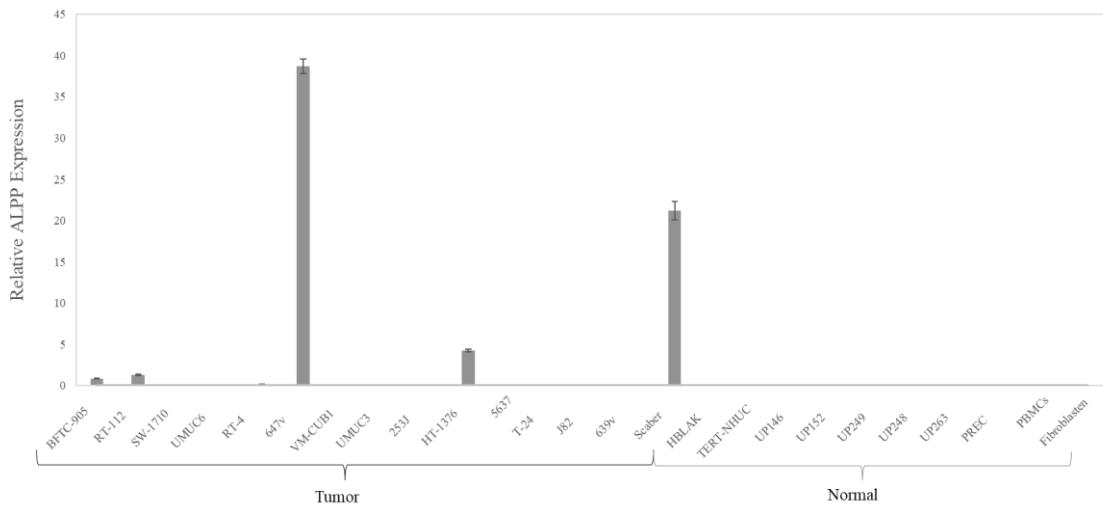


Abbildung 9: Relative ALPP Expression in Zelllinien. Die Expression von ALPP wurde mittels qRT-PCR in Tumorzelllinien (Tumor) und Zelllinien von normalen Zellen (Normal) bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des Haushaltgens *TBP* gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei *ALPP*. Aufgrund des verwandten Expressionsmusters wurde zunächst nur eins der beiden Gene weiter untersucht, es wurde *ALPP* ausgewählt.

Eine Übersicht zum Vorgehen folgt in der nächsten Abbildung.

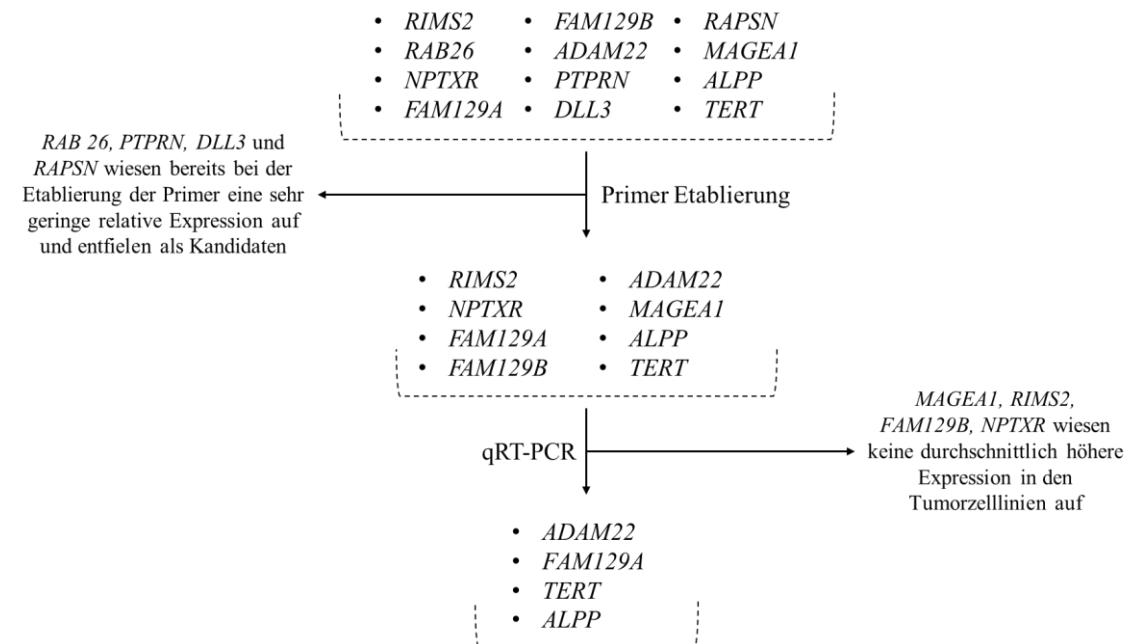


Abbildung 10: Übersicht zum Verlauf der in vitro Analysen. Die nach den *in silico* Analysen gefundenen Kandidaten sind auf oberster Ebene dargestellt, es folgen die unterschiedlichen Schritte der *in vitro* Analyse und die Selektion der Kandidaten für die *in vitro* Validierung.

3.3. In vitro Validierung der Kandidaten an mRNA aus Patientengeweben

Nach den Messungen an Zelllinien wurden folgende Kandidaten für die weitere Validierung an Patientengeweben ausgewählt: *ADAM22*, *FAM129A*, *TERT*, und *ALPP*. In einem nächsten Schritt wurde die tumorspezifische Expression an mRNAs aus gesundem Blasengewebe und aus urothelialen Blasenkarzinomen weiter validiert, diese wurden der Doktorandin zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

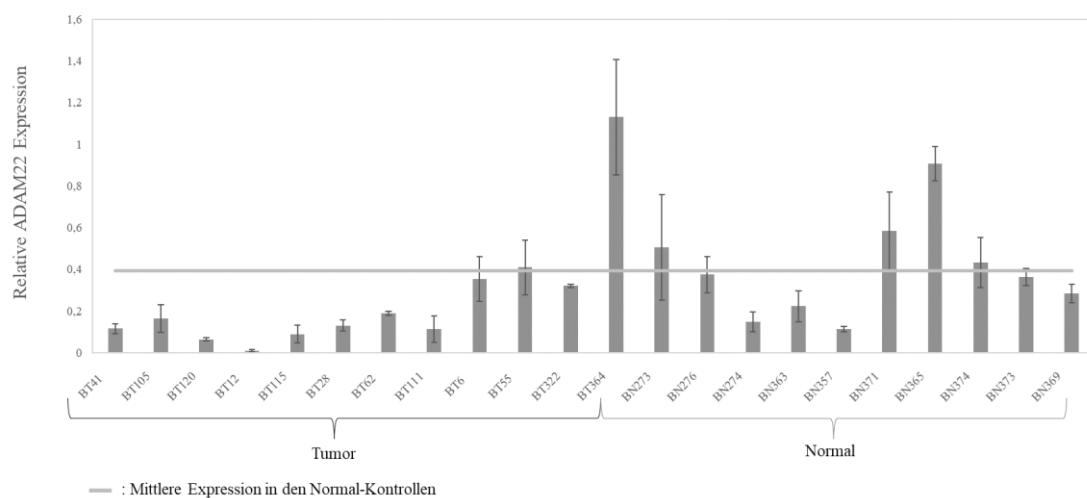


Abbildung 11: Relative ADAM22 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von *ADAM22* wurde mittels qRT-PCR in mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltgens *TBP* gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

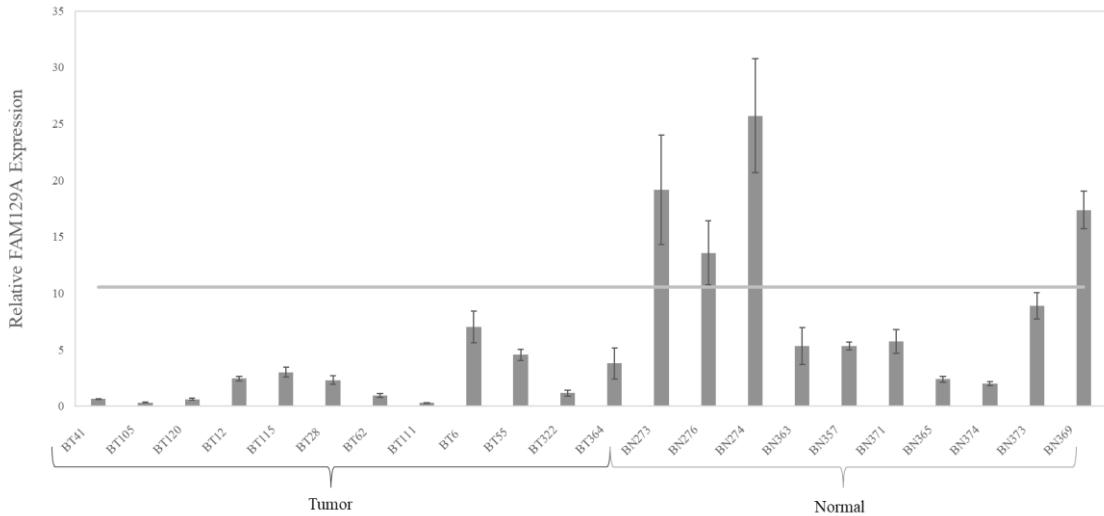


Abbildung 12: Relative FAM129A Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von FAM129A wurde mittels qRT-PCR in mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

ADAM22 und *FAM129A* zeigten eine durchschnittlich höhere Expression im Normalgewebe (Abb. 11 und Abb. 12), stellten sich also nicht als tumorspezifische Targets heraus. Aus den Daten des initialen Transkriptomvergleichs von HBLAK und diversen Urothelkarzinom-Zelllinien konnten somit keine geeigneten Targets identifiziert werden.

Im Folgenden wurde auch die Expression von *TERT* und *ALPP* weiter analysiert. Beide Gene wiesen eine höhere mittlere Expression in den Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben auf (Abb. 13 und Abb. 14). *TERT* wies dabei eine insgesamt stärkere Expression über viele Tumproben hinweg auf als *ALPP*, bei diesem Gen lag eine deutlich niedrigere relative Expression vor. Daher wurden Immunhistochemische-Färbungen (IHC) an den TMAs nur für *TERT* durchgeführt, während *ALPP* nicht weiterverfolgt wurde.

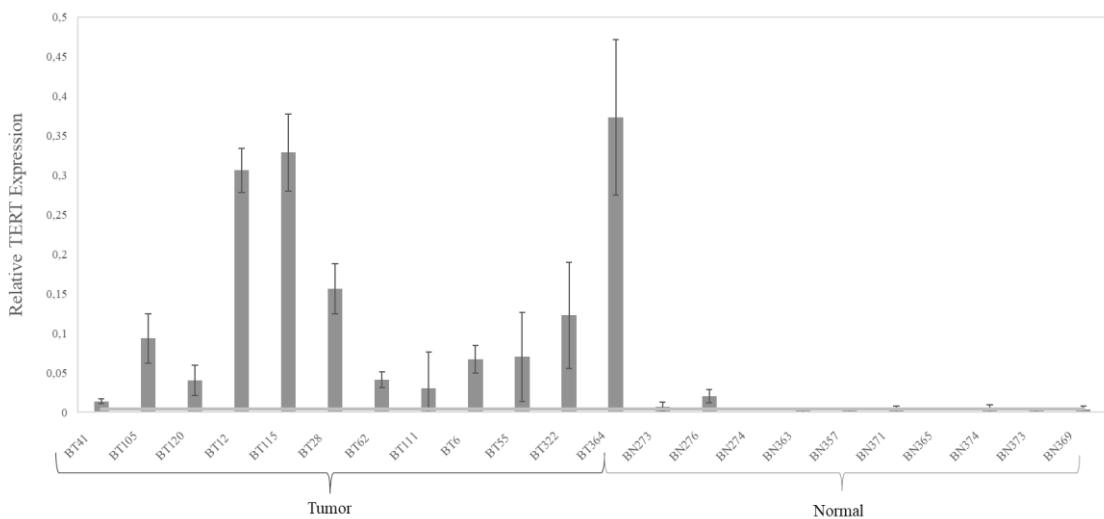


Abbildung 13: Relative TERT Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von TERT wurde mittels qRT-PCR in mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

Im Falle von *TERT* zeigte sich eine durchweg positive Expression in den Tumorproben, während die mRNA aus dem gesunden Blasengewebe keine oder nur eine sehr niedrige Expression aufwies. Die sich somit hier zeigende Tumorspezifität sollte nun weiter an den TMAs über IHC-Färbungen validiert werden.

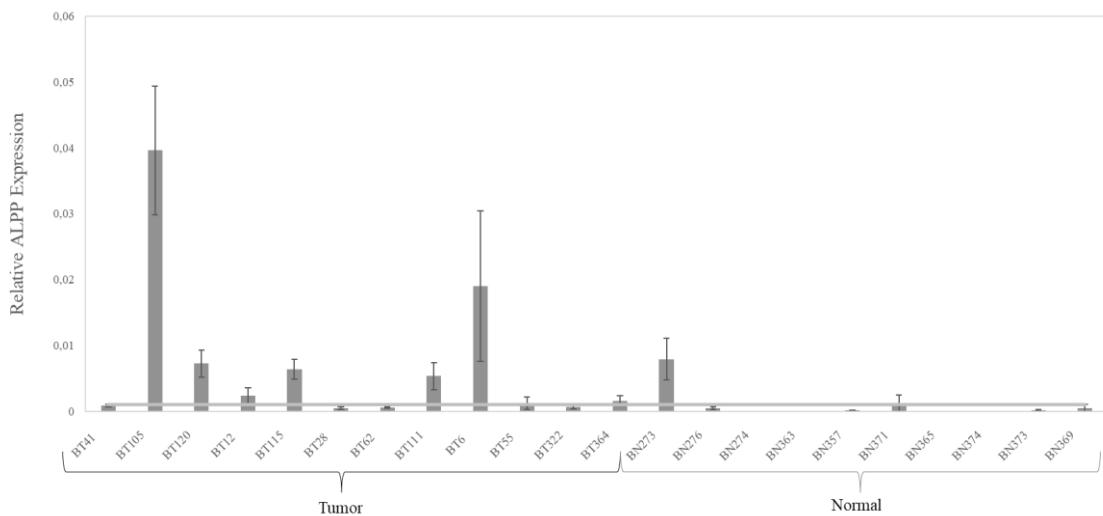


Abbildung 14: Relative ALPP Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von ALPP wurde mittels qRT-PCR in mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltsgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

ALPP wies zwar eine geringe oder keine Expression im Normalgewebe auf, zeigte sich aber auch in den Tumorproben nur gering oder sehr gering positiv. Da ein ausreichendes Färbesignal dementsprechend als unwahrscheinlich erachtet wurde, wurde dieser Marker nicht weiterverfolgt.

Für die anti-apoptotischen Gene *BIRC5* und *BCL2* lagen bereits Expressionsdaten in Zelllinien aus früheren Arbeiten vor. Daher wurde die weitere Analyse direkt mit den mRNAs aus Patientengeweben durchgeführt. *BIRC5* war höher im Tumorgewebe exprimiert (Abb. 15) und somit neben *TERT* der zweite Kandidat für die Färbungen und Validierungen an den TMAs. *BCL2* hingegen wies eine höhere mittlere Expression im Normal- als im Tumorgewebe auf, war also kein geeigneter Kandidat (Abb. 16).

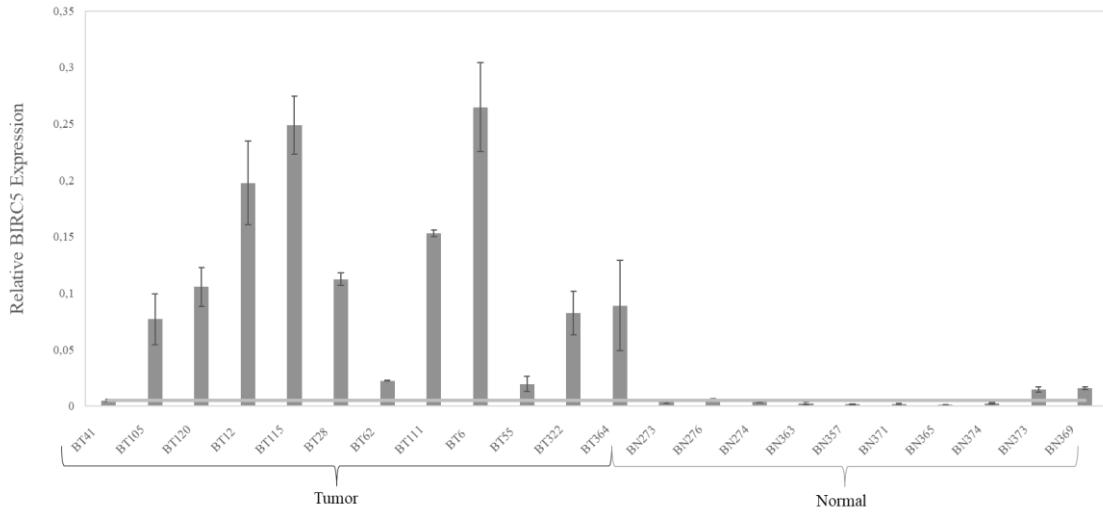


Abbildung 15: Relative BIRC5 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von BIRC5 wurde mittels qRT-PCR in mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

Wie oben erwähnt war *BIRC5* im Tumorgewebe durchweg positiv, während das Normalgewebe nur eine deutlich niedrigere Expression aufwies und somit ein potenziell tumorspezifischer Marker.

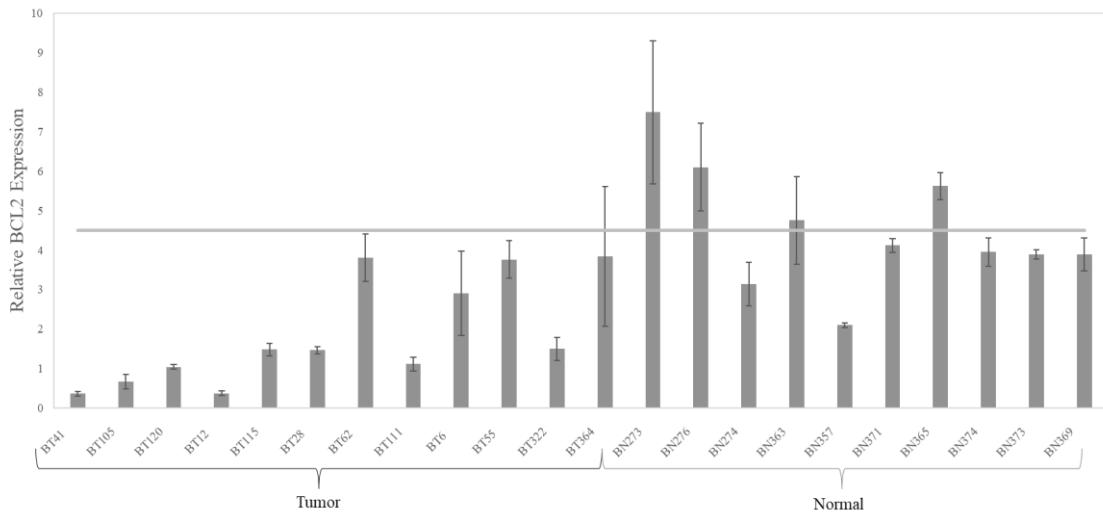


Abbildung 16: Relative BCL2 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von BCL2 wurde mittels qRT-PCR in mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

BCL2 hingegen wies ein gegensätzliches Expressionsmuster auf, hier lag die durchschnittliche Expression im Normalgewebe deutlich über der der Tumorproben. *BCL2* wurde somit nicht weiterverfolgt.

Ein Antikörper-Toxin-Konjugat, das sich gegen NECTIN4 richtet (Enfortumab vedotin), ist seit dem Jahre 2022 neben den USA auch in Deutschland zugelassen. Sacituzumab govitecan, ein Antikörper-Toxin-Konjugat gerichtet gegen TROP2, ist seit 2021 in den USA bereits für die Behandlung von Urothelkarzinomen, in Deutschland aktuell nur für die Behandlung des Mammakarzinoms zugelassen. Es bestand somit das Interesse, die tumorspezifische Expression auch dieser Gene weiter an unserer Patienten-Kohorte zu validieren. Die Analyse in den Zelllinien wurde hier übersprungen. Beide Gene wiesen eine höhere Expression in den Tumorgeweben auf, so dass Färbungen dieser Faktoren an den TMAs durchgeführt wurden (Abb. 17 und Abb. 18).

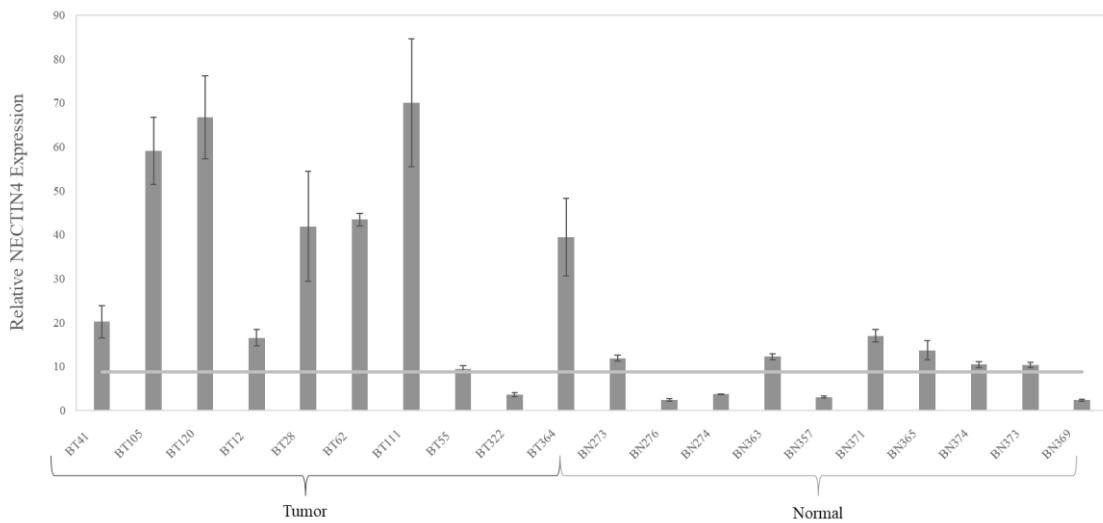


Abbildung 17: Relative NECTIN4 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von NECTIN4 wurde mittels qRT-PCR im mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

Abgesehen von einer Probe, BT322, lag die NECTIN4-Expression im Tumorgewebe stets über der mittleren Expression in den Normalkontrollen. Die hier gezeigte Tumorspezifität sollte nun weiter untersucht werden.

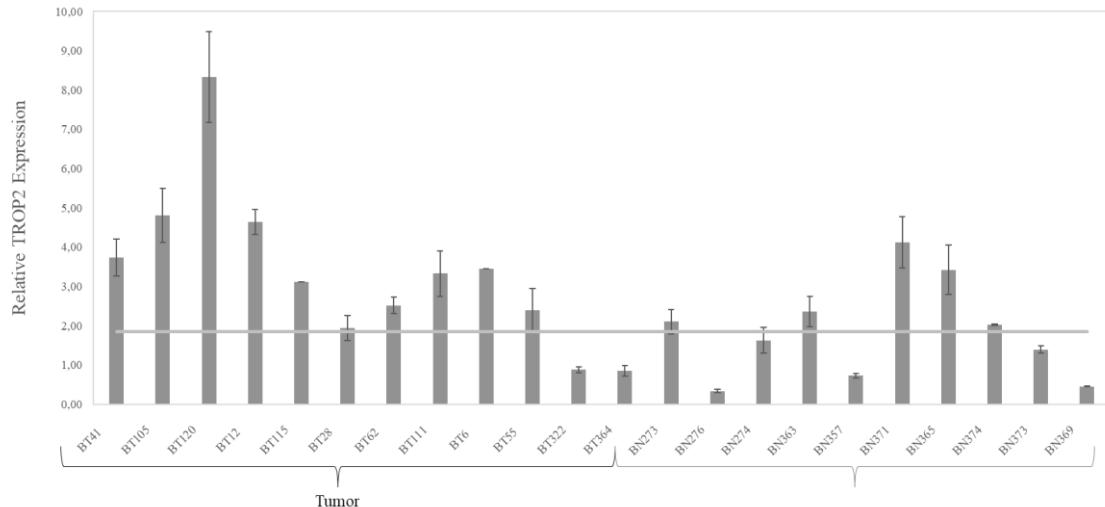


Abbildung 18: Relative TROP2 Expression in Blasen-Tumor- und Normalgewebe. Die Expression von TROP2 wurde mittels qRT-PCR in mRNA extrahiert aus erkranktem Blasengewebe (Tumor, BT) und gesundem Blasengewebe (Normal, BN) bestimmt. Zusätzlich wurde hier ebenfalls die Expression des Haushaltgens TBP gemessen, um die relative Expression zu berechnen. Die relativen Expressionswerte der Normalkontrollen wurden gemittelt und als graue Linie dargestellt. Um die Standardabweichung zu berechnen, wurden sämtliche Proben in Triplikaten gemessen.

Ähnliches traf für die Expression von TROP2 zu, beide Marker zeigten sich somit als tumorspezifisch und gute Kandidaten für die weitere Analyse an den TMAs.

3.4. Patienten-Kohorte der TMA-Analyse

Im Folgenden wird die Kohorte, aus welcher das in den TMAs verwendete Gewebe gezogen wurde, näher beschrieben. Es wurden insgesamt 60 Patienten mit muskelinvasiven Urothelkarzinomen in diese Arbeit eingeschlossen, diese wurden am Universitäts-Klinikum-Düsseldorf in den Jahren 2004 bis 2021 behandelt. Eingeschlossen wurden Patienten, bei denen eine Systemtherapie durchgeführt wurde und von denen archiviertes Gewebe an Universitätsklinikum Düsseldorf vorlag. Je nach erhaltenem Therapieregime lässt sich die Kohorte in vier Untergruppen einteilen: 19 Patienten haben Immun-Checkpoint-Inhibitoren (PD1/PD-L1 Inhibitoren), 19 eine neodjuvante, 26 eine palliative und fünf Patienten eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Einige Patienten haben mehr als ein Therapieregime durchlaufen, sind also Teil von mehr als einer Gruppe. So haben z.B. einige Patienten sowohl einen Immun-Checkpoint-Inhibitor als auch eine palliative Chemotherapie erhalten.

Klinische und pathologische Daten sowie die Klassifizierung der Tumoren sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 17) zusammengefasst. Die Patienten die eine perioperative Systemtherapie, also eine adjuvante (AC) oder neodjuvante Chemotherapie (NAC), erhalten haben wurden hier mit den Patienten verglichen, die einer Palliative Systemtherapie, also einer Immun-Checkpoint-Inhibitor (ICI) oder einer palliative Chemotherapie (Pall) zugeführt wurden.

Tabelle 17: Daten zum Patientenkollektiv, getrennt dargestellt für die perioperative (NAC/AC) und palliative (palliative Chemotherapie/ICI) Gruppen.

Variable	perioperativ NAC/AC		palliativ Pall/ICI
	n (%)	n (%)	
Gesamte Anzahl Patienten	24	41	
Alter (Median)	63 (48-84)	72 (50-88)	
Geschlecht			
weiblich	4 (17)	9 (22)	
männlich	20 (83)	32 (78)	
pTNM-Stadium bei ED			
pTa/pTis	1 (4)	5 (12)	
pT1	5 (21)	11 (27)	
pT2	16 (67)	17 (42)	
pT3	2 (8)	5 (12)	
pT4	0	3 (7)	
fehlend	/	/	
Lymphknoten-Invasion bei ED			
L0	3 (12,5)	6 (15)	
L+	3 (12,5)	6 (15)	
fehlend	18 (75)	29 (70)	
Metastasen im Verlauf			
M0	12 (50)	1 (2)	
M+	12 (50)	40 (98)	
fehlend	/	/	
Anzahl verstorbener Patienten	9 (38)	29 (71)	
Follow up Dauer, Median [Monate]	43	107	
Chemotherapie			
Cisplatin/Gemcitabin	24	29	
andere (Gemcitabin/Carboplatin)	4	18	
Anzahl Zyklen (Median)	4 (1-7)	6 (1-13)	
Immun-Checkpoint Inhibitoren			
Pembrolizumab	2	13	
Nivolumab	1	2	
Atezolizumab	0	5	

3.4.1 Überlebensanalyse

Es wurden zusätzlich für die gesamte Kohorte und die vier Therapiegruppen Überlebensanalysen durchgeführt, dargestellt mittels Kaplan-Meier-Kurven (Abbildung 19-23).

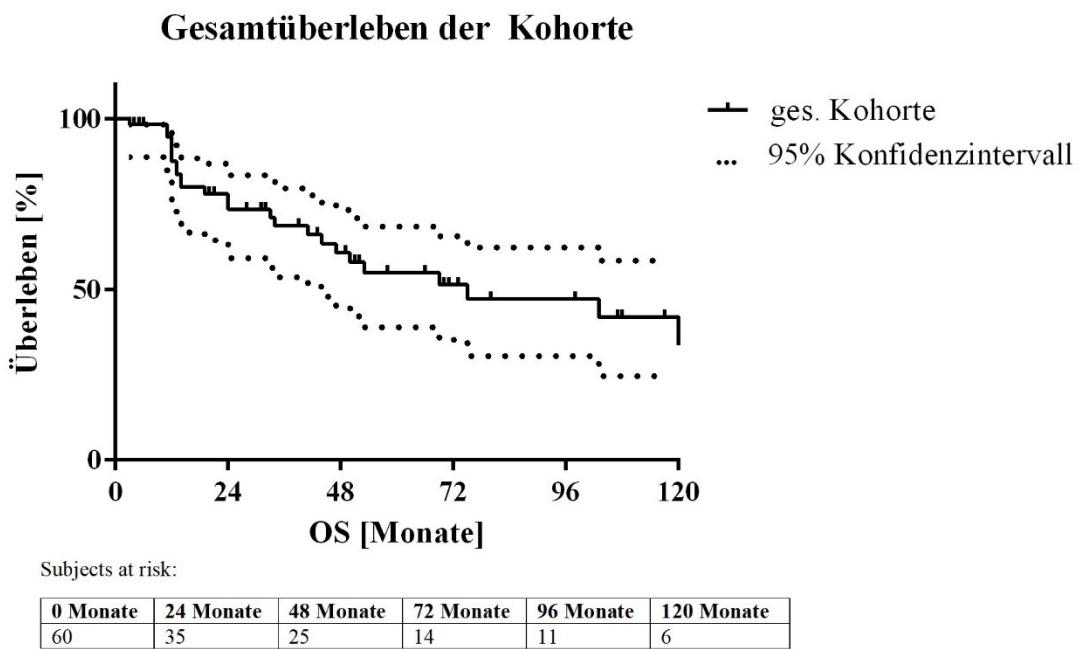


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der gesamten Kohorte. Unter der Kurve sind zusätzlich die subjects-at-risk dargestellt. Für die X-Achse wurde ein Maximum von 120 Monaten festgelegt. Die gepunkteten Linien zeigen die Ober- und Untergrenze des 95% Konfidenzintervall.

Die „subjects at risk“ bezeichnen die Patienten, die zu dem angegebenen Zeitpunkt noch leben und nicht censiert worden sind. Das mediane Überleben der gesamten Kohorte lag bei Median (Mdn) = 75 Monaten [95% KI: 44; N/A], das mediane Follow up bei Mdn = 66 Monaten [95% KI: 35; 102].

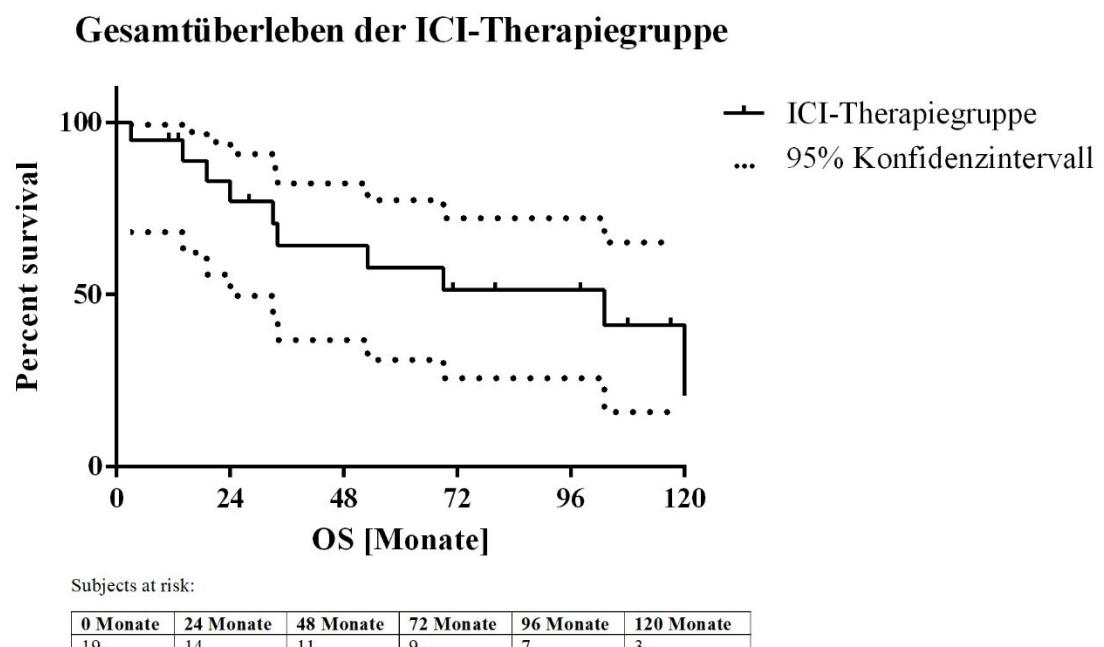


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der ICI-Therapiegruppe. Unter der Kurve sind zusätzlich die subjects-at-risk dargestellt. Für die X-Achse wurde ein Maximum von 120 Monaten festgelegt. Die gepunkteten Linien zeigen die Ober- und Untergrenze des 95% Konfidenzintervall.

Für die ICI-Therapiegruppe lag das mediane Überleben bei 103 Monaten [95%KI: 25; N/A], das mediane Follow up bei 108 Monaten [95%KI: 70,5; N/A].

Gesamtüberleben der NAC-Therapiegruppe

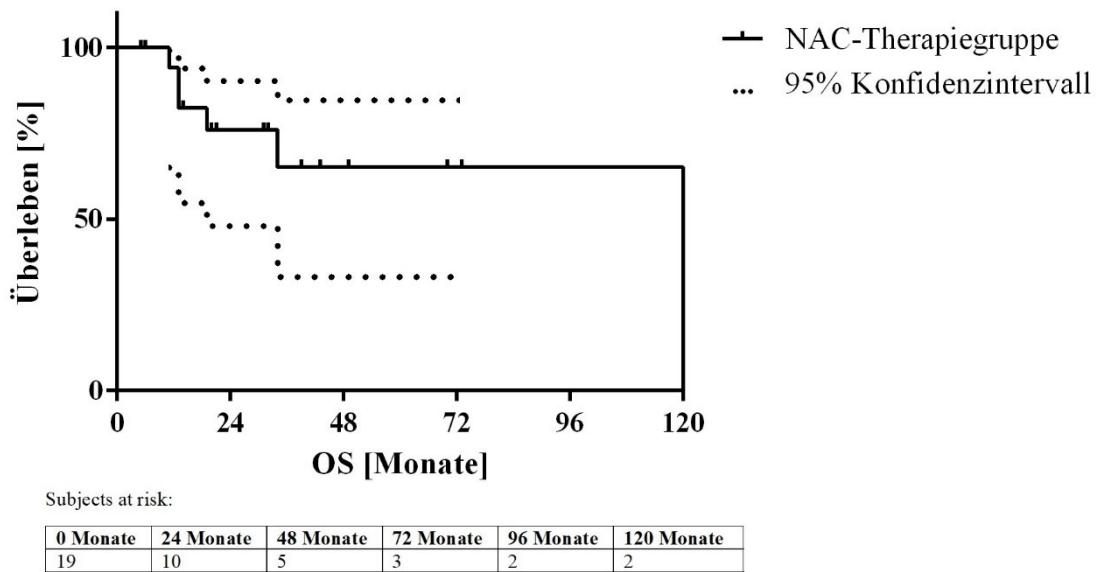


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der NAC-Therapiegruppe. Unter der Kurve sind zusätzlich die subjects-at-risk dargestellt. Für die X-Achse wurde ein Maximum von 120 Monaten festgelegt. Die gepunkteten Linien zeigen die Ober- und Untergrenze des 95% Konfidenzintervall.

Bei der Gruppe von Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, lag das mediane Überleben bei 122 Monaten [95%KI: 19,5; N/A], das mediane Follow up bei 32 Monaten [95%KI: 20; 48,5].

Gesamtüberleben der AC-Therapiegruppe

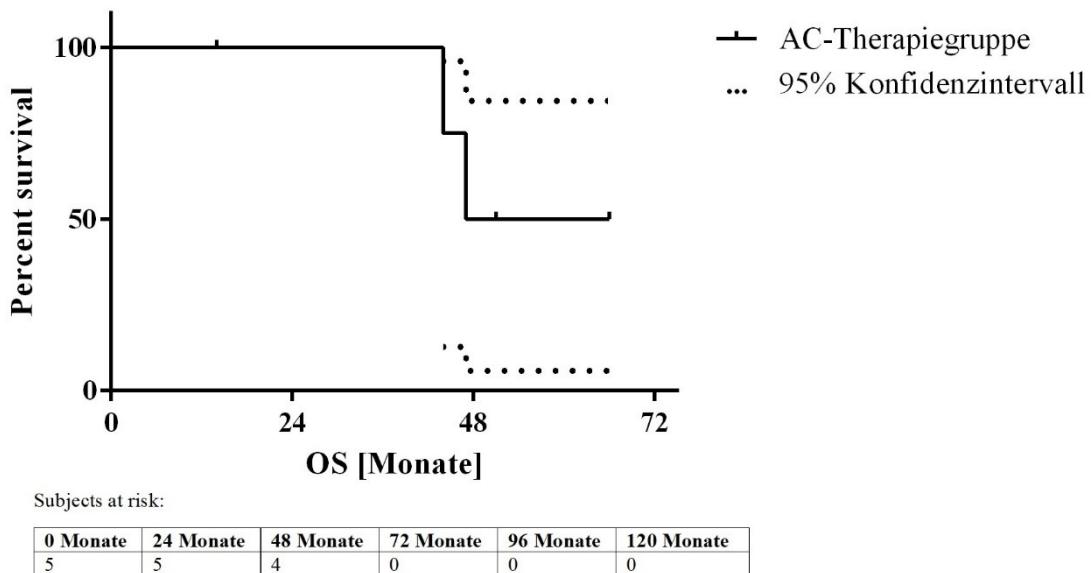


Abbildung 22: **Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der AC-Therapiegruppe.** Unter der Kurve sind zusätzlich die subjects-at-risk dargestellt. Für die X-Achse wurde ein Maximum von 72 Monaten festgelegt. Die gepunkteten Linien zeigen die Ober- und Untergrenze des 95% Konfidenzintervall.

Für die AC-Therapiegruppe zeigte sich ein medianes Überleben von 56,5 Monaten [95%KI: N/A; N/A] bei einem medianen *Follow up* von 51 Monaten [95%KI: N/A; 66].

Gesamtüberleben der Palliativen-Therapiegruppe

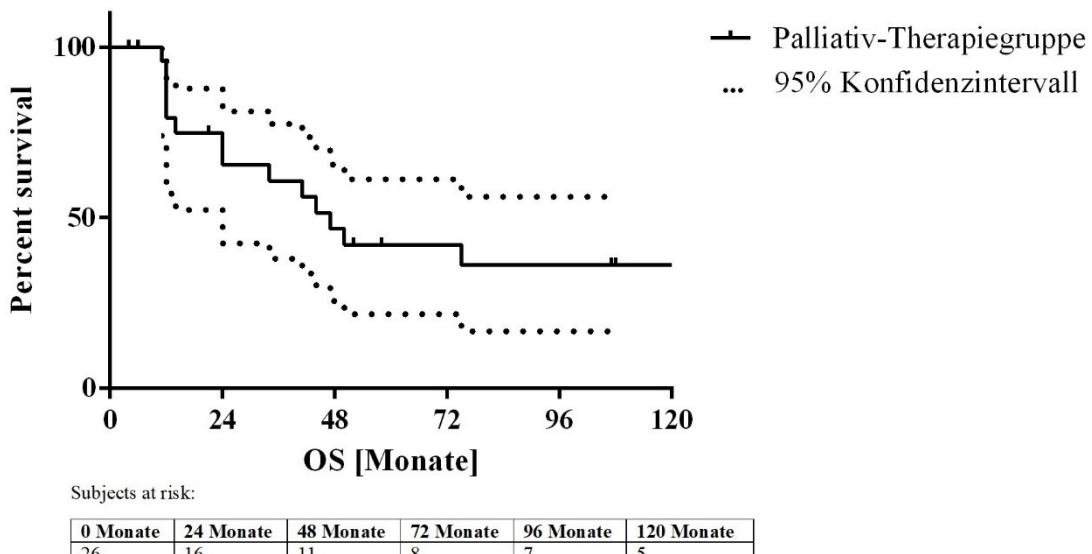


Abbildung 23: **Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der Palliativen-Chemotherapiegruppe.** Unter der Kurve sind zusätzlich die subjects-at-risk dargestellt. Für die X-Achse wurde ein Maximum von 120 Monaten festgelegt. Die gepunkteten Linien zeigen die Ober- und Untergrenze des 95% Konfidenzintervall.

Ein medianes Überleben von 47 Monaten [95%KI: 23,5; N/A] bei einem medianen *Follow up* von 108 Monaten [95%KI: 48; 148] wies die palliative Behandlungsgruppe auf.

3.5 Validierung von Kandidaten mittels immunhistochemischer Färbung eines TMAs

In einem letzten Schritt zur Validierung der Tumorspezifität der experimentellen Marker wurden wie oben erwähnt immunhistochemische Färbungen an manuell erstellten *Tissuemicroarrays* (TMA), die das Gewebe der oben beschriebenen Kohorte enthielten, durchgeführt.

In unserer Studie wurde für die TMAs ein Core-Durchmesser von 1,5 mm ausgewählt, ein TMA konnte somit maximal 48 unterschiedliche Proben enthalten. Je sechs dieser Proben dienten als Negativ- Kontrollen: zwei Cores enthielten gesunde Lymphknoten-Pulpa und vier Cores so genanntes „*matched tissue*“. Für dieses haben wir nicht kanzerös befallenes Harnblasengewebe zweier Patienten aus unserer Kohorte verwendet. Die restlichen Cores der TMAs enthielten das Tumorgewebe, dieses wurde aus drei unterschiedlichen Eingriffs-Typen gewonnen: Transurethralen Resektionen der Blase, Zystektomien, und Metastasen-Biopsien. Für jeden pro Patient vorhandenen Eingriff waren in unseren TMAs zwei Cores vorgesehen. Von den nach diesem Schema erstellten TMA-FFPE-Blöcken wurden anschließend Schnitte angefertigt und diese gefärbt.

Neben der Validierung der Tumorspezifität der in vitro identifizierten Marker TERT, TROP2 und NECTIN4 sowie von EGFR und CD44v6 sollte die Kohorte außerdem über immunhistochemische Färbungen in molekulare Subtypen nach Sjödahl *et al.* eingeteilt werden. Außerdem wurden Färbungen für Proliferations- (Ki67) und Inflammationsmarker (CD4, CD8, FOXP3) sowie verschiedene Immuncheckpoint-Inhibitor-Targets (PD-L1, PD1, LAG3, TIGIT) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den kommenden Abschnitten abgebildet. Für jeden Core wurde ein Auswertungsbogen angefertigt und ausgefüllt.

Die Bewertung bzw. Skalen der Expression der einzelnen Marker sind dem Abschnitt „2.4 Immunhistochemische Färbung und Auswertungen“ im Material und Methoden Teil zu entnehmen. Um die Tumorspezifität weiter zu prüfen, wurde die Expression in den Tumor-Cores mit Normalkontrollen, bestehend aus gesunden Lymphknotengewebe, verglichen. In den folgenden Abbildungen ist das Färbeverhalten der fünf Marker dargestellt.

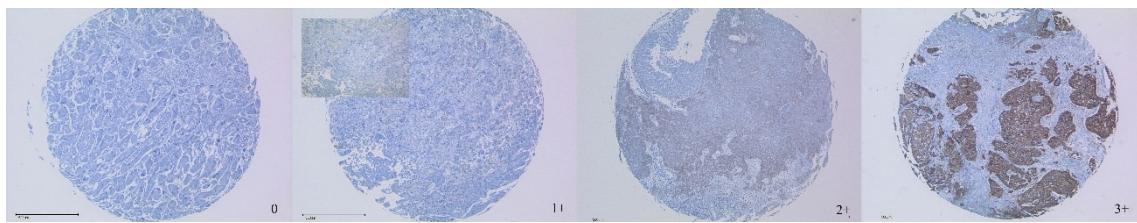


Abbildung 24: **EGFR Auswertungs-Skala**, es handelt sich hier ausschließlich um cores, die Tumorgewebe enthalten. Das positive Färbesignal zeigt sich braun, die Expression nimmt von links nach rechts zu.

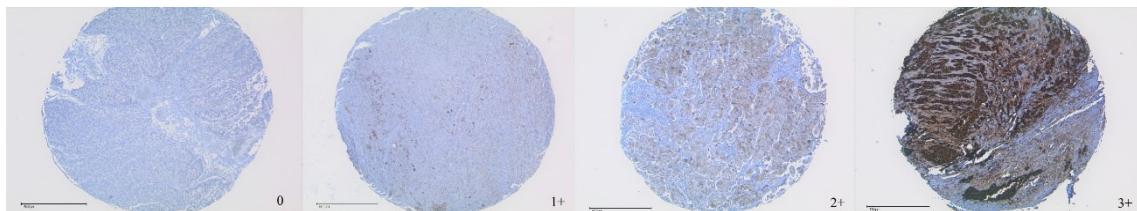


Abbildung 25: **CD44v6 Auswertungs-Skala**, es handelt sich hier ausschließlich um cores, die Tumorgewebe enthalten. Das positive Färbesignal zeigt sich braun, die Expression nimmt von links nach rechts zu.

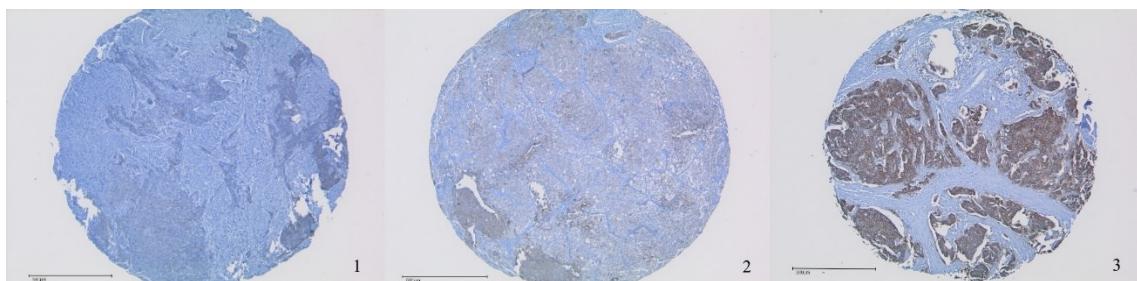


Abbildung 26: **TROP2 H-Score Skala**, es handelt sich hier ausschließlich um cores, die Tumorgewebe enthalten. Das positive Färbesignal zeigt sich braun, die Expression nimmt von links nach rechts zu.

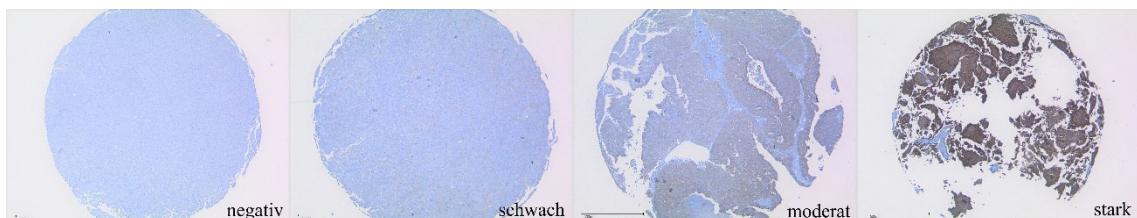


Abbildung 27: **NECTIN4 H-Score Skala**, es handelt sich hier ausschließlich um cores, die Tumorgewebe enthalten. Das positive Färbesignal zeigt sich braun, die Expression nimmt von links nach rechts zu.

Im Falle von **EGFR**, **CD44v6**, **TROP2** und **NECTIN4** zeigte sich eine spezifische plasmamembranäre Färbung, welche nur bei einem starken Färbesignal auf die anderen Zellkompartimente überging.

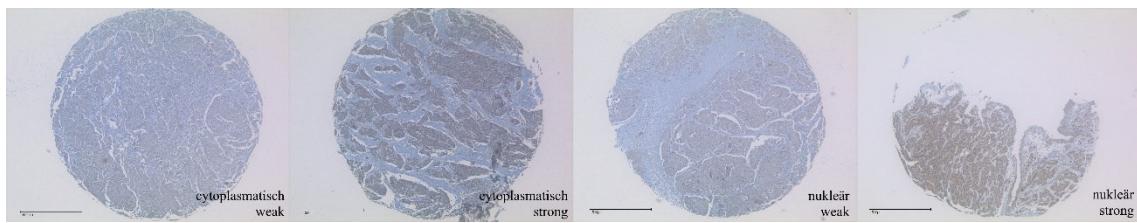


Abbildung 28: **TERT IRS Skala**, es handelt sich hier ausschließlich um cores, die Tumorgewebe enthalten. Das positive Färbesignal zeigt sich braun. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt das schwache und starke zytoplasmatische Färbesignal, die rechte das Gleiche für die nukleäre Expression.

TERT hingegen zeigte verstärkt cytoplasmatische und nukleäre Färbungen, die eine solitäre Beurteilung der membranären Ausprägung unmöglich machten. Somit wurde hier entschieden, zunächst die cytoplasmatische und nukleäre Färbung getrennt zu bewerten, um zukünftige Fragestellungen unter Umständen beantworten zu können. Die intrazelluläre Lokalisation von TERT ist noch nicht vollständig erforscht, neben der membranären, cytoplasmatischen und nukleären Lokalisation werden auch weitere Zellkompartimente erforscht und diskutiert. In der Diskussion wird hierauf weiter eingegangen.

Im Folgenden ist die Anzahl der TMA-Cores, die einer jeweiligen Auswertungskategorie (z. B. schwache, mittlere, starke Expression) angehören, in Form von gestapelten Säulendiagrammen graphisch dargestellt (Abbildung 29 bis 34). Für die fünf experimentellen Marker wurden jeweils die drei Eingriffstypen, TURBs, Zystektomien und Metastasen-Biopsien, sowie das Lymphknoten-Gewebe (LK) abgebildet.

Das ideale Therapietarget für eine CAR-T-Zell Therapie sollte einen hohen Anteil positiver Proben (mindestens eine schwache Expression) im Tumorgewebe, also in TURBs, Zystektomien und Metastasen, und möglichst keine Positivität in den Lymphknoten-Normalkontrollen aufweisen. Dieser prozentuale Anteil ist in Tabelle 18 dargestellt.

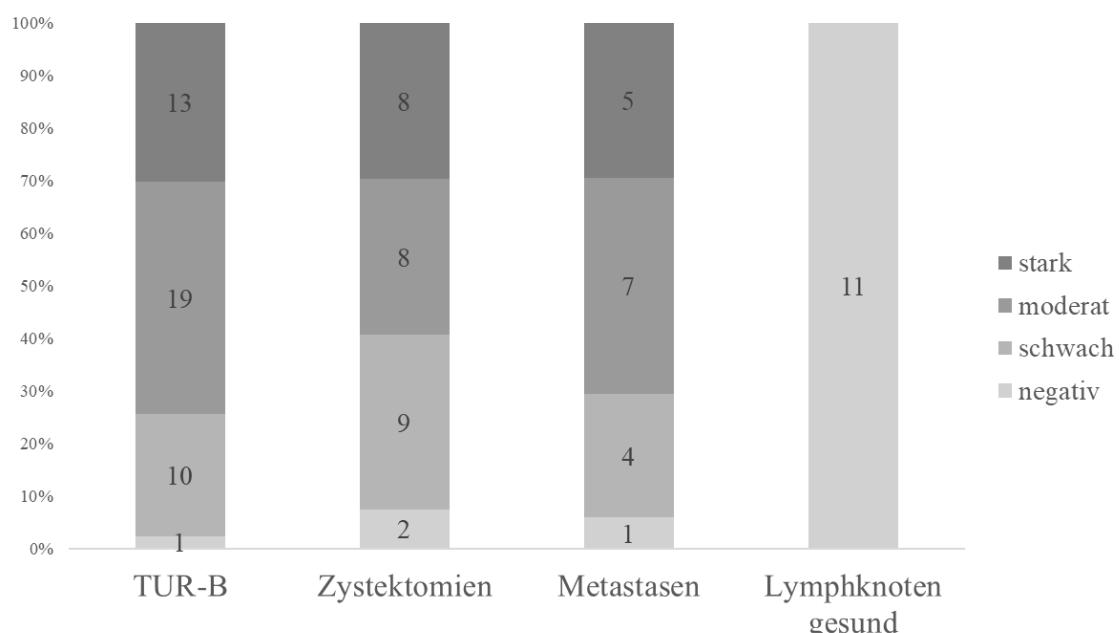


Abbildung 29: NECTIN4 Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen, in den Säulen sind die Anzahlen der zugehörigen Cores angegeben, die y-Achse wurde auf 100% gesetzt.

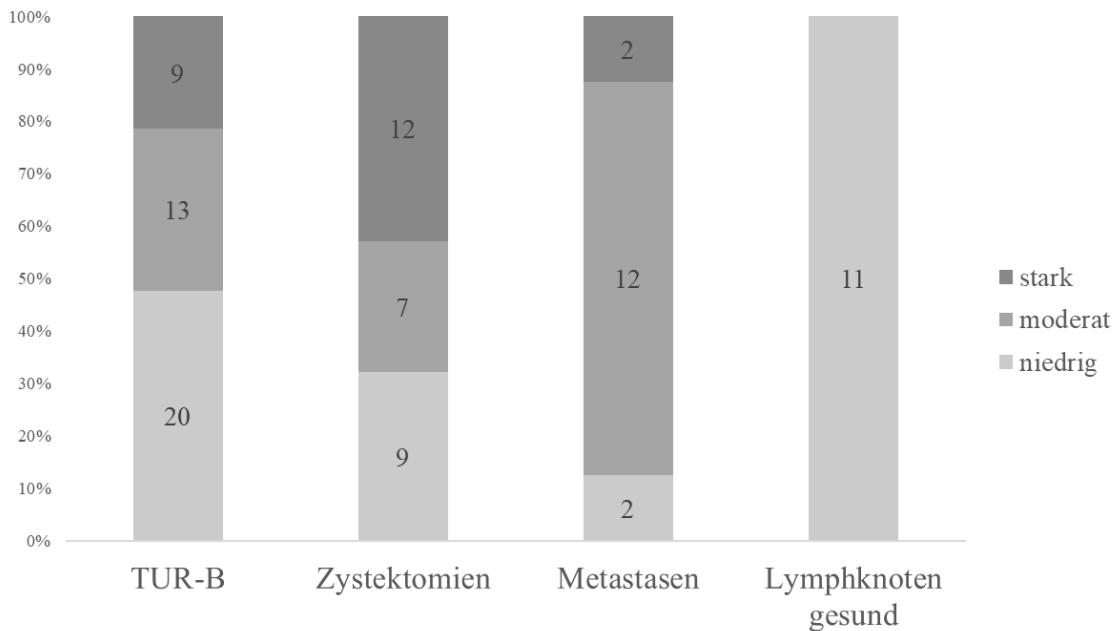


Abbildung 30: TROP2 Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen, in den Säulen sind die Anzahlen der zugehörigen Cores angegeben, die y-Achse wurde auf 100% gesetzt.

NECTIN4 und TROP2 entsprachen diesen Vorgaben am meisten. Beide Marker zeigten sich gänzlich negativ in den Normalkontrollen (0% positive Proben) und wiesen einen hohen Anteil positiver Proben im Tumorgewebe von 95% bzw. 93% auf. Unabhängig von der Gewebelokalisation/ dem Eingriffstyp (Primärtumor in den TURBs und Zystektomien oder Metastase) und des Behandlungszeitpunkts (Primärdiagnose, fortgeschrittenes Stadium) waren nahezu alle Tumorproben NECTIN4-positiv, wohingegen der Anteil an positiv gefärbten Proben bei TROP2 vom Primärtumor zu den Metastasen zunahm (ca. 55% vs. 90% positive Proben) und somit deutlichere Differenzen in Bezug auf die Gewebslokalisierung und den Eingriffstypen vorlagen.

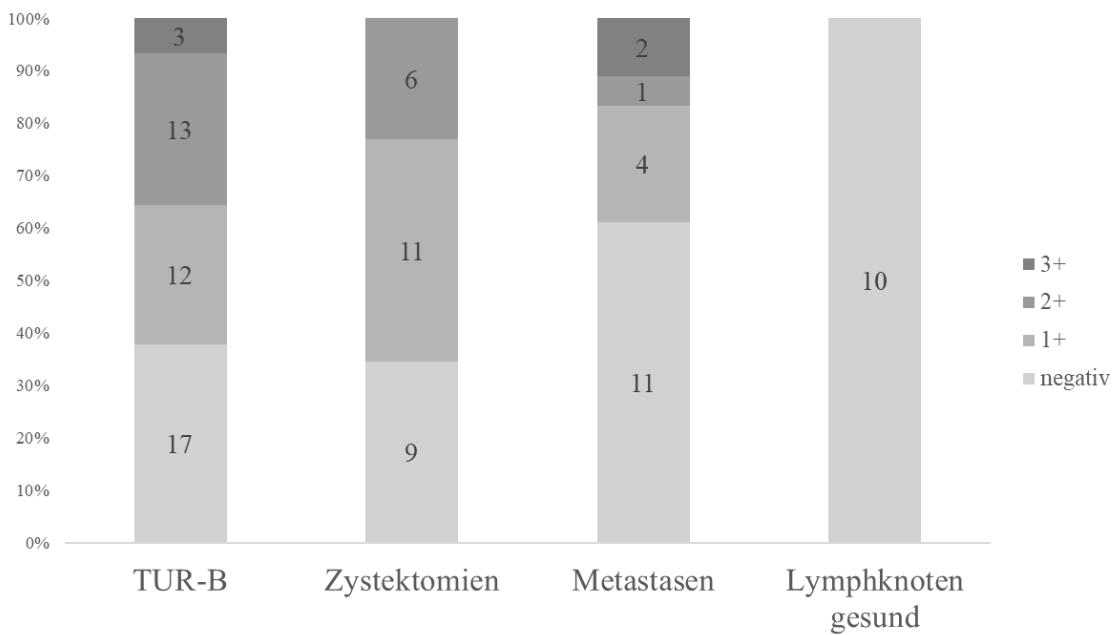


Abbildung 31: EGFR Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen, in den Säulen sind die Anzahlen der zugehörigen Cores angegeben, die y-Achse wurde auf 100% gesetzt.

EGFR zeigte ebenfalls keine Expression im Lymphknoten, gleichzeitig allerdings auch keine gleichmäßig hohe Expression in den Eingriffen, der Anteil positiver Proben lag hier durchschnittlich bei lediglich 58%.

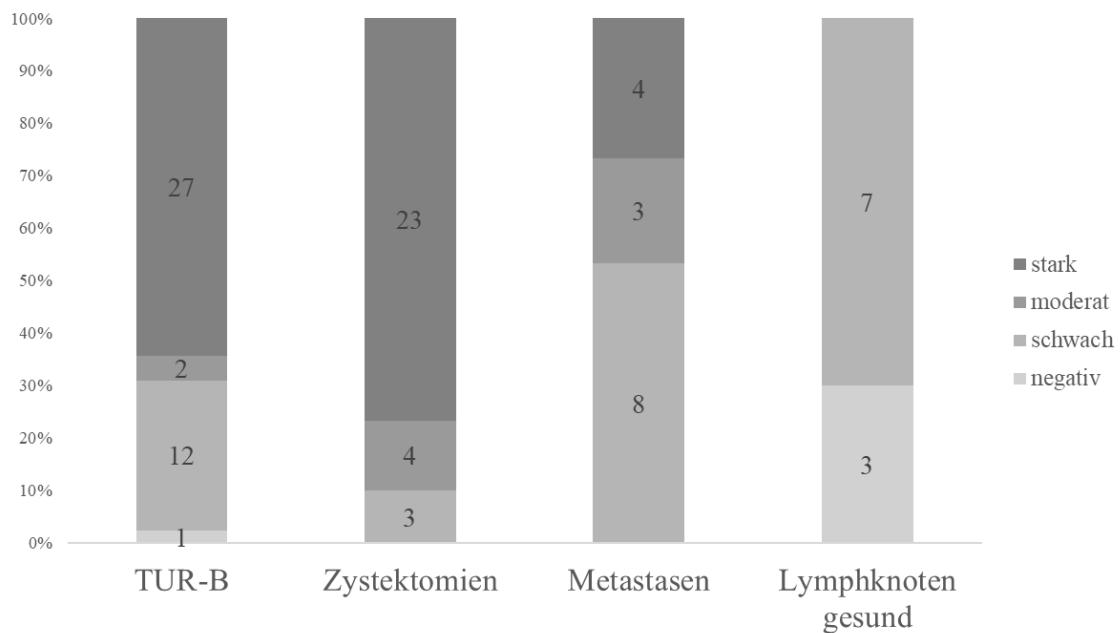


Abbildung 32: CD44v6 Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen, in den Säulen sind die Anzahlen der zugehörigen Cores angegeben, die y-Achse wurde auf 100% gesetzt.

Im Falle von CD44v6 zeigte sich zwar eine beständige Positivität von 99% im Tumorgewebe, aber es konnte auch in 70% der Normalkontrollen eine Expression nachgewiesen werden.

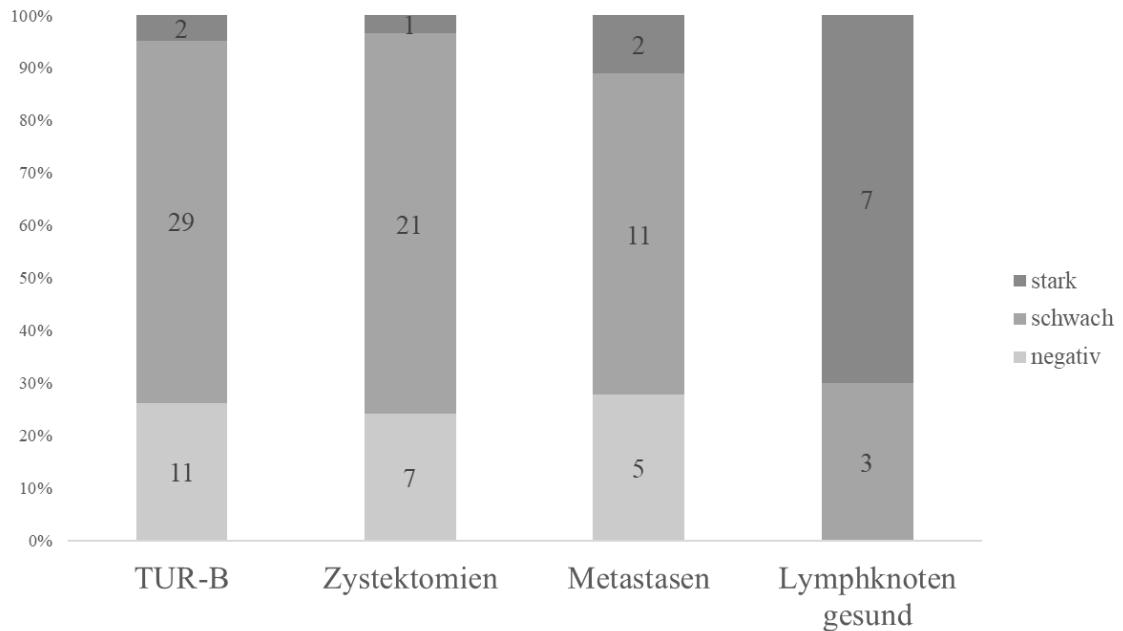


Abbildung 33: cytoplasmatische TERT Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen, in den Säulen sind die Anzahlen der zugehörigen Cores angegeben, die y-Achse wurde auf 100% gesetzt.

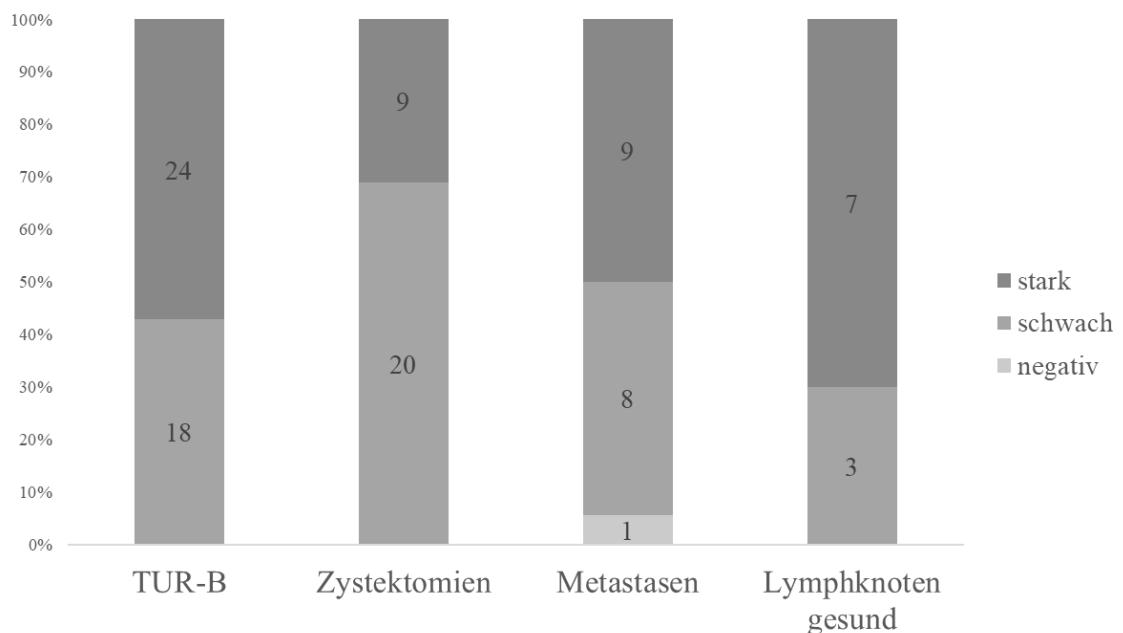


Abbildung 34: nukleäre TERT Expression in den Gewebeproben aus unterschiedlicher Eingriffstypen und LK-Normalkontrollen, in den Säulen sind die Anzahlen der zugehörigen Cores angegeben, die y-Achse wurde auf 100% gesetzt.

Den höchsten Anteil positiver Proben in den Normalkontrollen wies TERT auf, sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Expression. Hier waren 100% der Cores positiv. Eine TERT-Aktivität ist allerdings in aktivierte Lymphozyten physiologisch, wodurch sich dies erklären lassen könnte. Der Anteil im Tumorgewebe lag bei 74% bzw. 99%. Der Marker TERT entsprach somit nicht den gestellten Anforderungen. CD44v6 und EGFR zeigten sich im Vergleich zu NECTIN4 und TROP2 als nicht gleichwertig tumorspezifische Marker.

Tabelle 18: Anteil positiver Proben pro Marker

Anteil positiver Proben	TERTc	TERTn	NECTIN4	TROP2	CD44v6	EGFR
Tumor	74%	99%	95%	93%	99%	58%
LK gesund	100%	100%	0%	0%	70%	0%

Zu Beginn war auch ein Vergleich mit so genanntem „*matched tissue*“, gewonnen aus nicht-mit-Tumor-befallenen Blasenanteilen zweier Patienten unserer Kohorte, geplant. Hier kam es allerdings zu Problemen in der Durchführung. Das gewählte Gewebe zeigte die gleiche Expression bzw. Positivität für die Marker, wie das korrespondierende Tumorgewebe, und eignete sich somit nicht als eine Negativ-Kontrolle. Auf die möglichen Ursachen wird in der Diskussion im Abschnitt 4.1.3. weiter eingegangen. Hier wurde auf die weitere graphische Darstellung verzichtet.

3.6. Klinische und Molekularpathologische Charakterisierung

3.6.1. Molekulare Subtypen

Eine Unterteilung der Kohorte in molekulare Subtypen wurde anhand einer Publikation von Sjödahl *et al* aus dem Jahre 2019 vorgenommen (Sjödahl *et al.* 2019). In dem hier vorgeschlagenen Algorithmus zur immunhistochemischen Subtypisierung von muskelinvasivem Blasenkrebs werden fünf Typen beschrieben: *urothelial-like* (URO), *genomically unstable* (GU), *basal/SCC-like*, *mesenchymal-like* (Mes-like) und *small-cell/neuroendocrine-like*. Der URO- und GU-Subtyp stellen dabei die Luminalen Subtypen dar.

Neben dem von Sjödahl *et al* entwickelten Ansatz bestehen noch viele weitere, teilweise überlappende und teilweise divergierende Ansätze zur Subtypisierung von Urothelkarzinomen der Blase, im Abschnitt „1.9. Molekulare Subtypisierung“ der Einleitung wird hier genauer darauf eingegangen. Was die verschiedenen Studien gemein haben, ist, dass die festgelegten Subtypen mit unterschiedlichen Prognosen und Therapieansprechen in Verbindung gebracht werden konnten. Der somit mögliche prädiktive Wert der molekularen Subtypen, der eine Patienten-

spezifische Behandlung ermöglichen könnte, sollte weiter erforscht werden. Hier ist es erforderlich, eine große Anzahl an unabhängigen Kohorten mit zum einen Daten zum klinischen *Follow up* und zum anderen zur Subtypisierung bezüglich des Überlebens und des Therapieansprechens zu analysieren und zu vergleichen. Die Analyse der UKD-hauseigenen Kohorte in diesem Projekt soll zu diesem großen Bestreben beitragen.

In den beiden folgenden Abbildungen ist der Algorithmus der Subtypisierung sowie beispielhafte Färbungen der Tumorcores aus unseren TMAs für die Subtypen dargestellt:

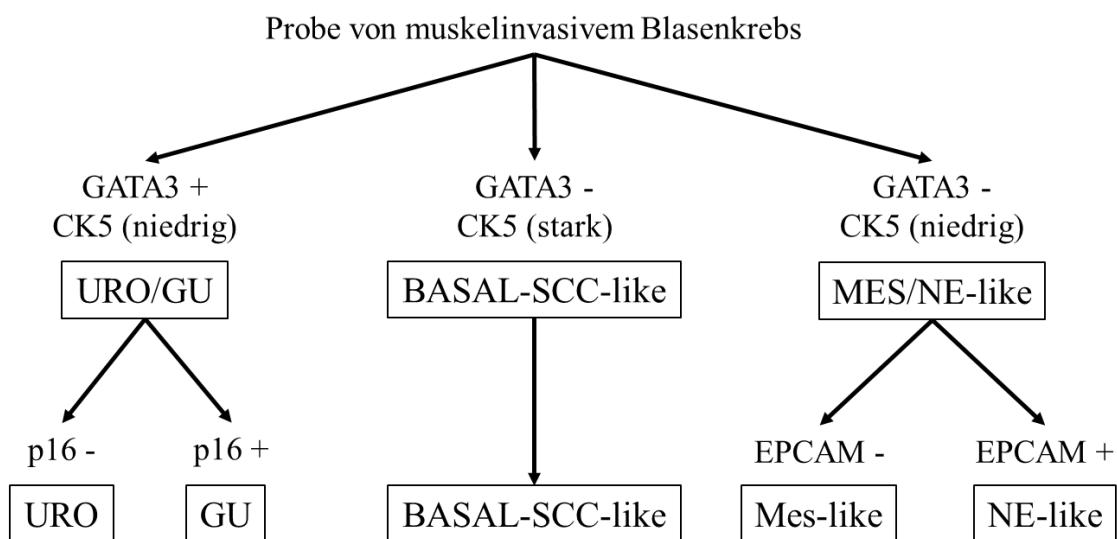


Abbildung 35: Für die immunhistochemische Subtypisierung von muskelinvasivem Blasenkrebs vorgeschlagener Algorithmus, Abbildung modifiziert nach Sjödahl et al, 2019 (PMID:30604486). Die Pfeile zeigen die für die Subtypisierung nötigen immunhistochemischen Färbungen an. Die Unterteilung beginnt mit IHC-Färbungen für die Marker GATA3 und CK5. Liegt eine positive GATA3 und eine niedrige bis negative Färbung für CK5 vor, ist das Präparat Teil des URO oder des GU-Subtypen, zur weiteren Differenzierung muss eine Färbung des Markers p16 erfolgen. Zeigt sich die Färbung negativ ist das Präparat dem URO-, zeigt es sich jedoch positiv dem GU-Subtyp zuzuordnen. Bei einer starken CK5 und einer negativen GATA3 Färbung liegt der Basal-SCC-like Subtyp vor, hier sind keine weiteren Färbungen erforderlich. Zeigen beide Marker (GATA3, CK5) ein niedriges oder negatives Färbesignal, liegt der Mes- oder NE-like Subtyp vor, hier erfolgt zur weiteren Unterteilung eine Färbung des Markers EpCAM. Dieser ist im Falle des Mes-like Typen negativ, im Fall des NE-like Typen positiv. In der Publikation von Sjödahl et al wurde eine weitere, optionale Ebene an Tests zur Validierung der Subtypen vorgeschlagen. Diese beinhalteten sowohl weitere IHC-Färbungen als auch histologische Merkmale der Präparate. Da sich diese Publikation auf die oben abgebildeten Schritte beschränkt wurde hier auf die Abbildung verzichtet.

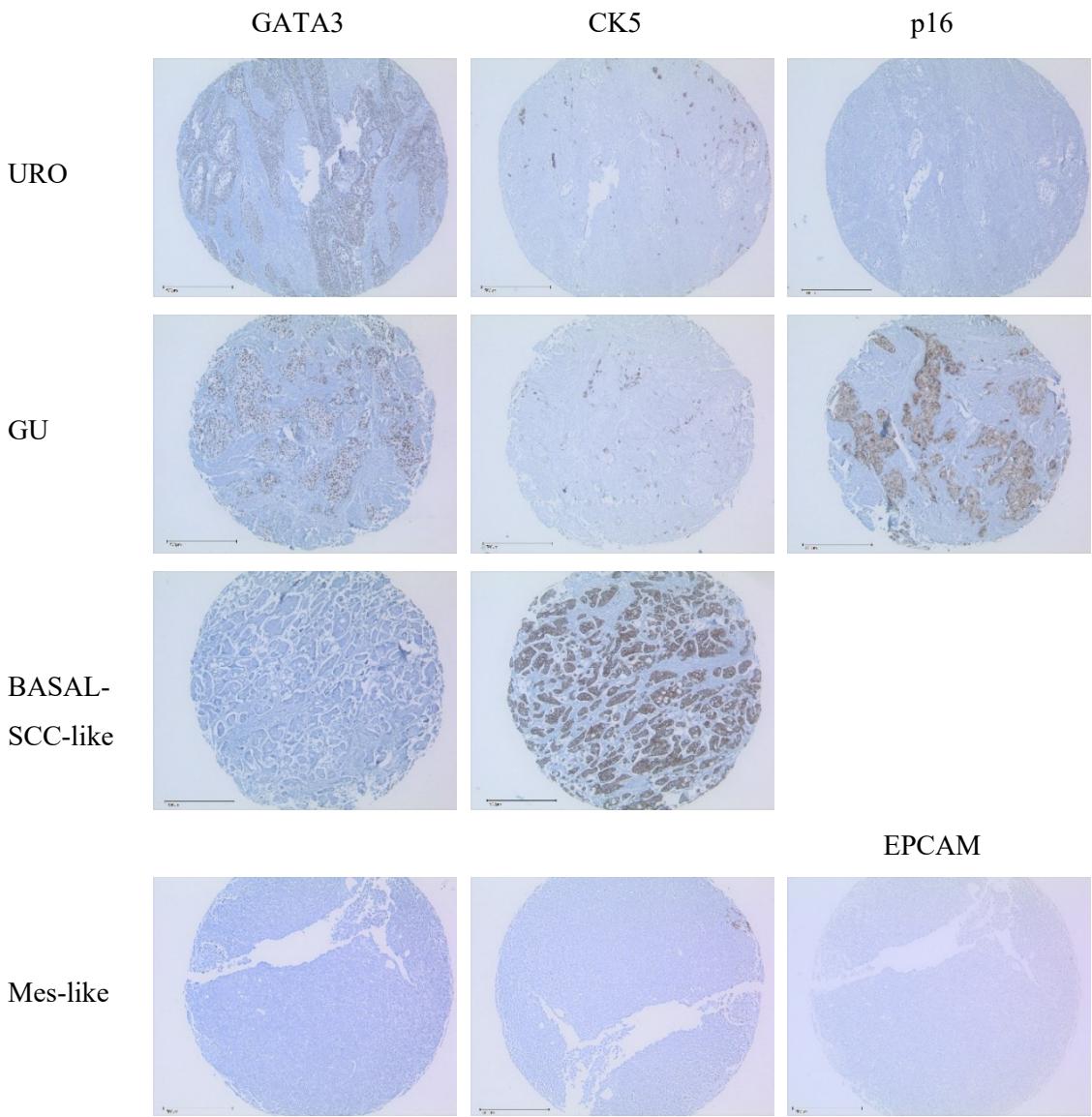


Abbildung 36: Beispielhafte Färbungen der von Sjödahl et al vorgeschlagenen Subtypen. Es sind hier ausschließlich Tumor-enthaltende Cores der manuell erstellten TMAs abgebildet, ein positives Färbesignal stellt sich hier braun dar. Da in unserer Kohorte kein Patient mit dem NE-like Subtypen vorlag, fehlt das entsprechende Bildbeispiel.

In dieser Arbeit wird lediglich die Subtypisierung unserer Kohorte vorgestellt, eine Korrelation dieser Subtypen zu den klinischen Daten der Patienten wird in zukünftigen Publikationen folgen.

Der Anteil der Subtypen ist im Folgenden, getrennt für die Proben aus den Trans-urethralen Resektionen der Blase und den Zystektomien, in Tortendiagrammen in ganzen Zahlen und prozentual dargestellt, jeweils für die gesamte Kohorte und die vier Therapiegruppen: Immun-Checkpoint-Therapie (ICI), neoadjuvante Chemotherapie (NAC), adjuvante Chemotherapie (AC) und palliative Chemotherapie.

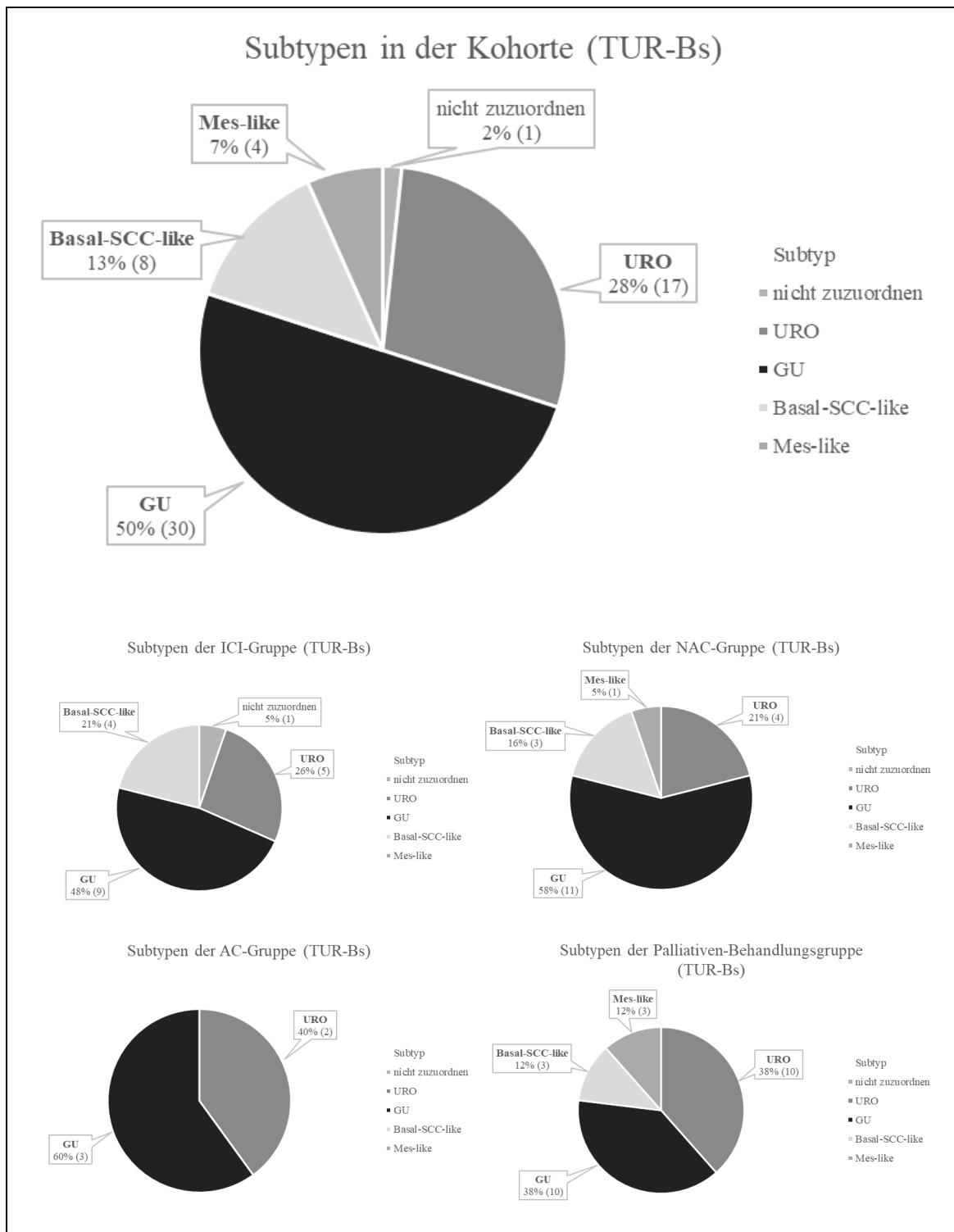


Abbildung 37: Prozentualer Anteil der molekularen Subtypen in den TURBs, dargestellt für die gesamte Kohorte und die Therapiegruppen

In der Kohorte machten mit insgesamt 50% (n=30) den größten Anteil die Patienten mit dem GU, also dem genetisch instabilen Subtyp, aus. An zweiter Stelle stand der URO-Subtyp mit 28% (n=17) und an dritter Stelle mit 13% (n=8) der Basal-SCC-like Subtyp. An letzter Stelle steht der Mes-like Subtyp mit 7% (n=4). Kein Patient gehörte dem Neuroendokrin-ähnlichen Subtypen an und ein Patient ließ sich auf Grund von technisch mangelndem Gewebe in den TMAs

immunhistochemisch nicht zuordnen. Diese Verteilung spiegelte sich auch weitgehend in den einzelnen Therapiegruppen wider und entspricht im Wesentlichen einer klassischen Verteilung, die sich auch in anderen Kohorten beobachten lässt. In der Diskussion wird hierauf weiter eingegangen.

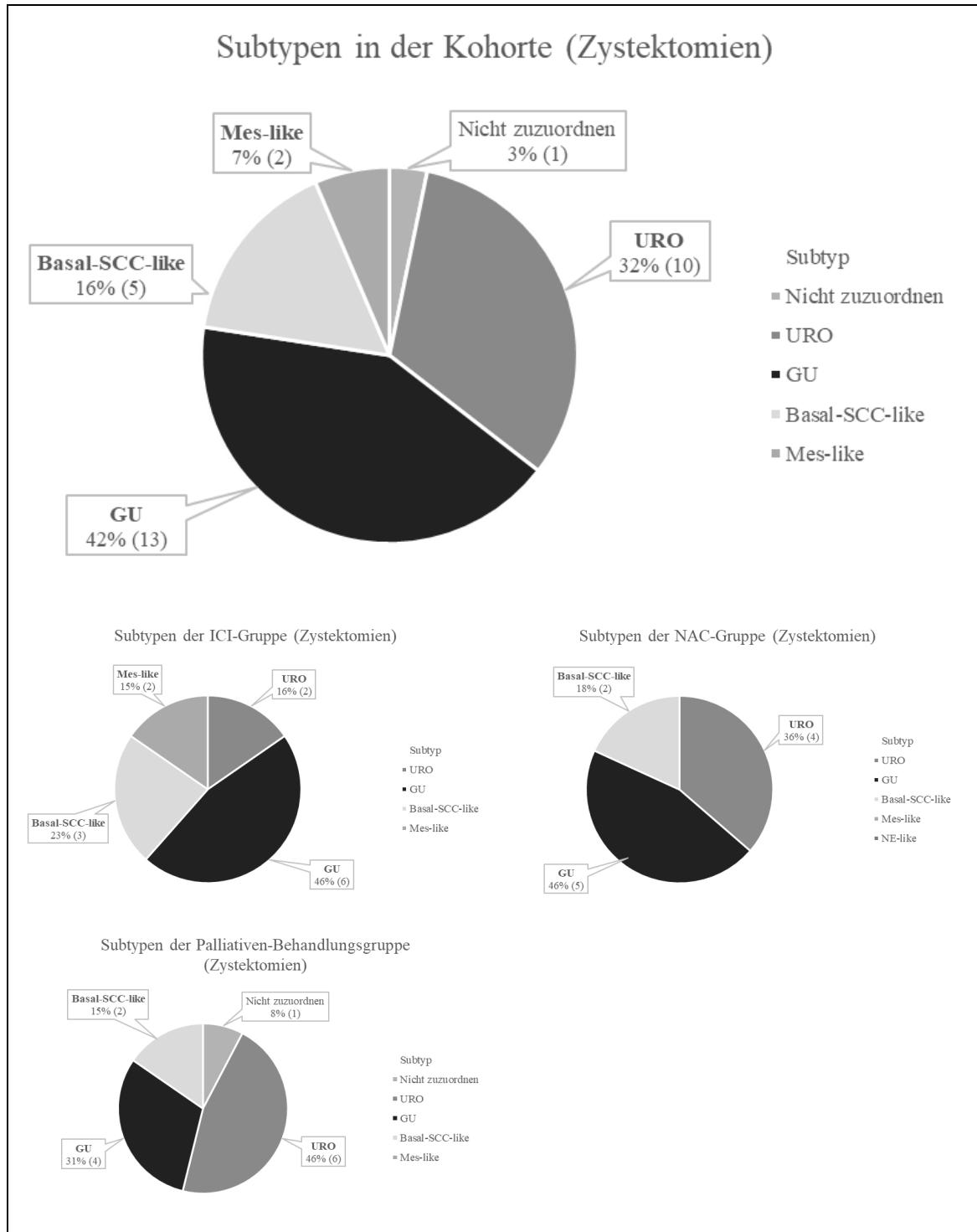


Abbildung 38: Prozentualer Anteil der molekularen Subtypen in den Zystektomien, dargestellt für die gesamte Kohorte und die Therapiegruppen (es lagen keine Zystektomien in der AC-Gruppe vor)

Auch in den Zystektomie-Präparaten zeigten sich ähnliche Verhältnisse zwischen den unterschiedlichen Subtypen, mit den GU-Subtypen quantitativ an erster Stelle, gefolgt vom URO- und dem Basal-SCC-like-Subtypen und dem Mes-like-Subtypen, wenn denn vorhanden, an letzter Stelle. Lediglich in der Gruppe der palliativ behandelten Patienten machte der URO-Subtyp mit 46% (n=6) den größten Anteil aus und in der ICI-Gruppe lag der Basal-SCC-like-Typ mit 21% (n=3) häufiger vor als der URO-Subtyp mit 16% (n=2).

3.6.2. Charakterisierung von Immunmarkern

Die molekulare Charakterisierung unserer Kohorte stellte ein weiteres unserer Ziele dar. Neben der Unterteilung in molekulare Subtypen erfolgte auch eine Erhebung der Expression von Immuncheckpoint-Proteinen, und zwar von PD-1, PD-L1, LAG3 und TIGIT, sowie die Bestimmung der Inflammationsmarkern CD4, CD8 und FOXP3 über weitere immunhistochemische Färbungen. Da in der Behandlung des Urothelkarzinoms der Blase die Immuntherapie, so z. B. die Immun-Checkpoint-Inhibitoren, gerichtet gegen PD-L1 oder PD-1, zunehmend an Bedeutung gewinnt, war die Expression dieser Marker für uns von Interesse.

Für die Auswertung der Immun-Marker CD4, CD8, FOXP3, LAG3 und TIGIT liegt keine Blasentumor-spezifische Publikation vor, die Auswertung wurde somit analog zur klinischen Routine des Instituts der Pathologie durchgeführt. Die Expression wurde in zwei Kompartimenten betrachtet, den Tumor- und Stroma-Anteilen der *cores*. Der genaue Mechanismus ist dem Abschnitt „2.4 Immunhistochemische Färbungen und Auswertung“ des Material-und-Methoden-Teils zu entnehmen. Für die fünf Marker wird hier der positiv gefärbte Prozentsatz in Relation zur gesamten Lymphozyten-Zellzahl angegeben. Die gesamte Lymphozyten-Zellzahl setzt sich zusammen aus den CD4 positiven T-Helferzellen, den CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen und den FOXP3 positiven regulatorischen T-Zellen. In den folgenden Abbildungen werden diese Prozentsätze der beiden Kompartimente getrennt für die drei Eingriffstypen, TUR-B, Zystektomien und Metastasen, in Form von Boxplots dargestellt.

Es wurde zusätzlich ein Mittelwerts-Vergleich zwischen den Tumor- und Stroma-Kompartimenten durchgeführt. Hierzu wurde bei nicht-gegebener-Normalverteilung ein Whitney-U-Test und bei vorliegender Normalverteilung ein Student-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.

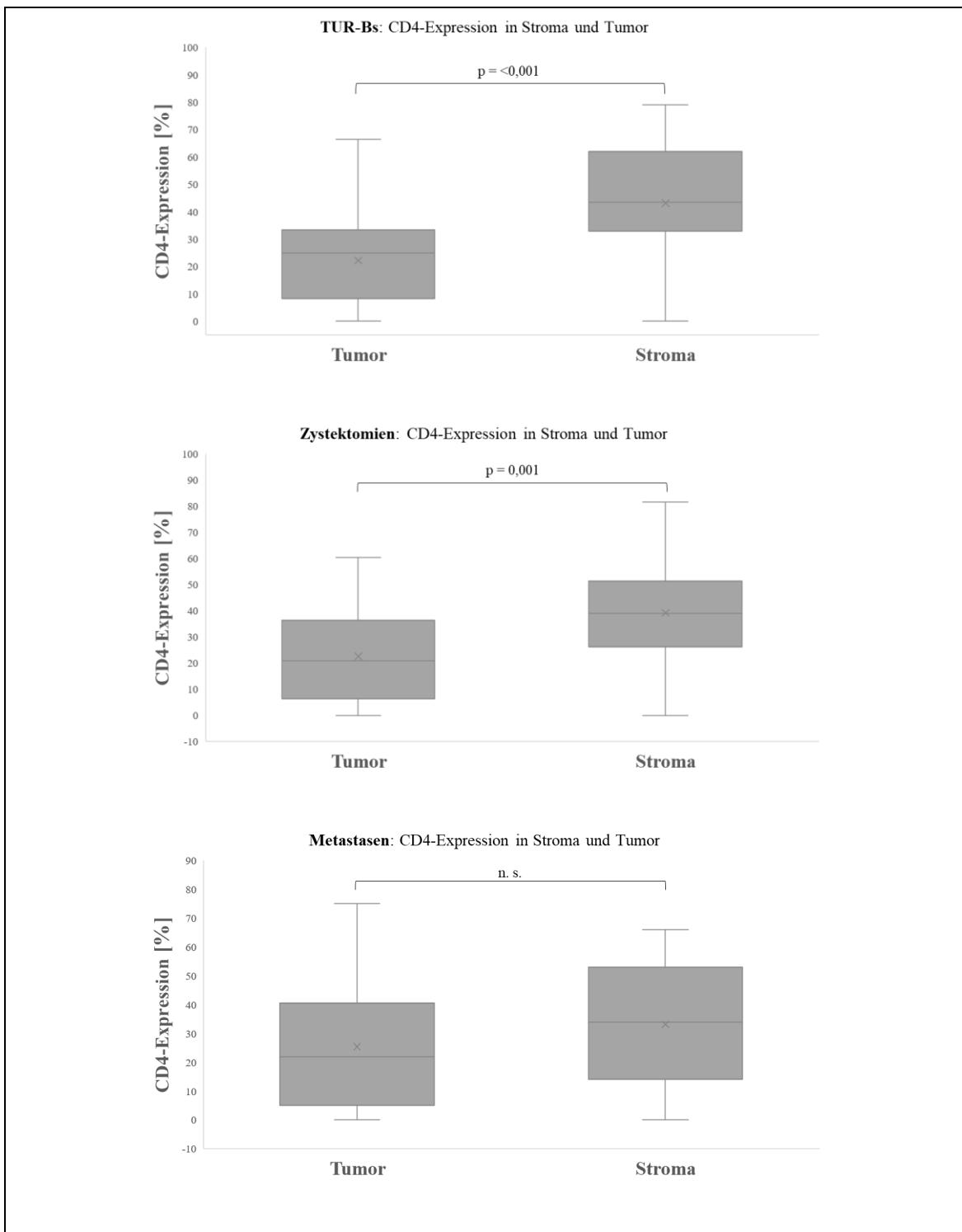


Abbildung 39: **CD4-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment**, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. In allen drei Beispielen fand zwischen den beiden Kompartimenten ein Mittelwerts-Vergleich mittels eines t-Tests für unabhängige Stichproben statt.

In den TUR-B war die CD4-Expression in den 39 vorhandenen Stroma-Anteilen der Proben (Mittelwert (M) = 43,1, Standardabweichung (SD) = 21,25) signifikant höher als in den 45 Tumor-Anteilen (M = 22,17, SD = 15,51); t-Wert (82) = -5,2, $p = <0,001$, zweiseitig getestet. Gleiches traf auf die Zystektomien zu, hier lagen 28 Tumor (M = 22,52, SD = 18,34) und 29

Stroma-Anteile der Proben ($M = 39,2$, $SD = 17,86$) vor; $t(55) = -3,48$, $p = 0,001$, zweiseitig getestet. In den Metastasen hingegen ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen.

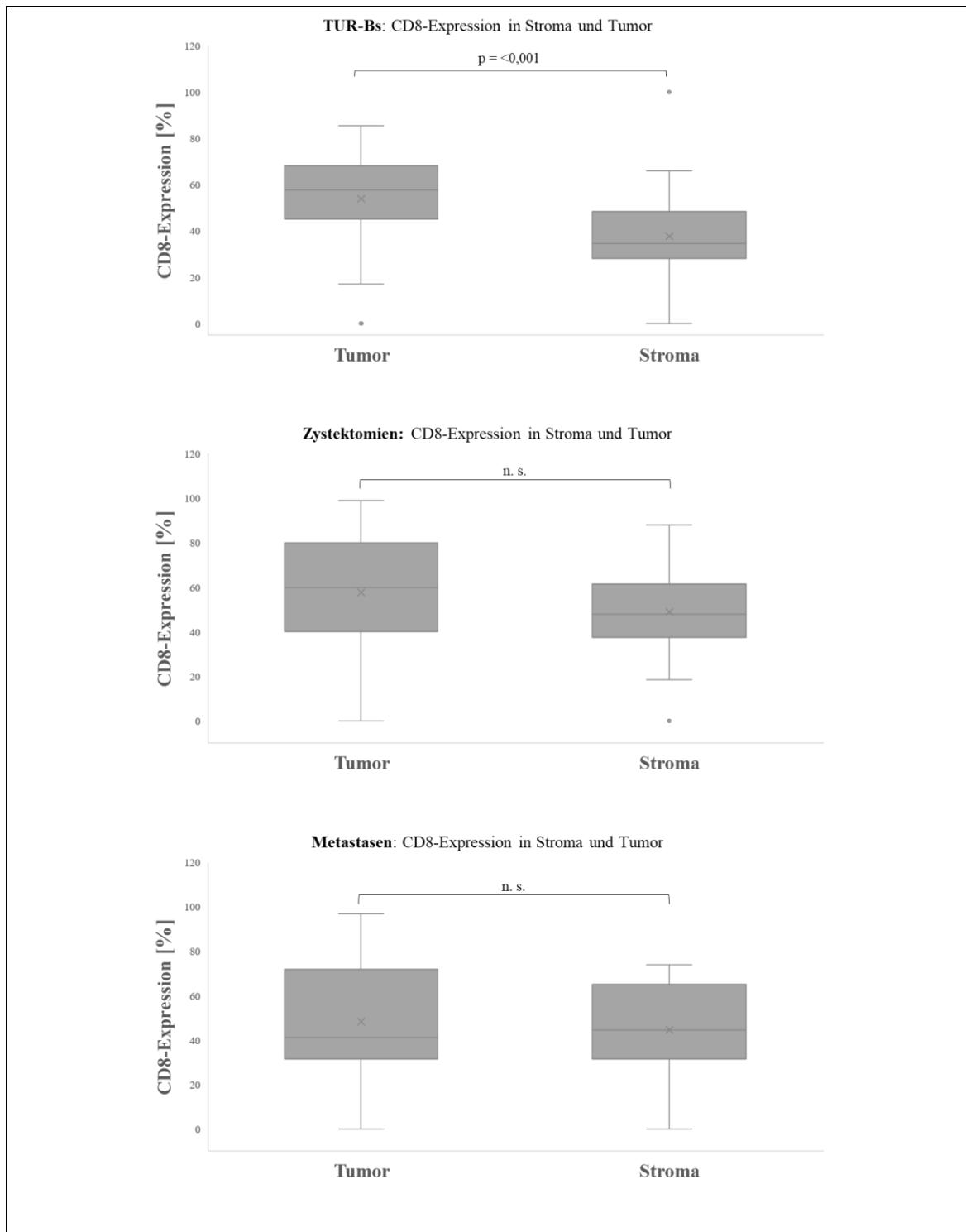


Abbildung 40: **CD8-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment**, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. Für die TUR-B fand ein Mittelwerts-Vergleich der Expression in den beiden Kompartimenten mittels Whitney-U-Test, für die Zystektomien und Metastasen mittels einem t-Test für unabhängige Stichproben statt.

Im Falle der CD8-Expression zeigte sich lediglich in den TUR-B ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression im Tumor und Stroma-Kompartiment. In den 45 Tumor-Anteilen ($M = 53,94$, $SD = 21,37$) war die CD8-Expression signifikant höher als in den 39 Stroma-Anteilen ($M = 37,6$, $SD = 20,1$); $z = -4,078$, $p = <0,001$, zweiseitig getestet. Für die Zystektomien und Metastasen ließ sich keine Signifikanz nachweisen.

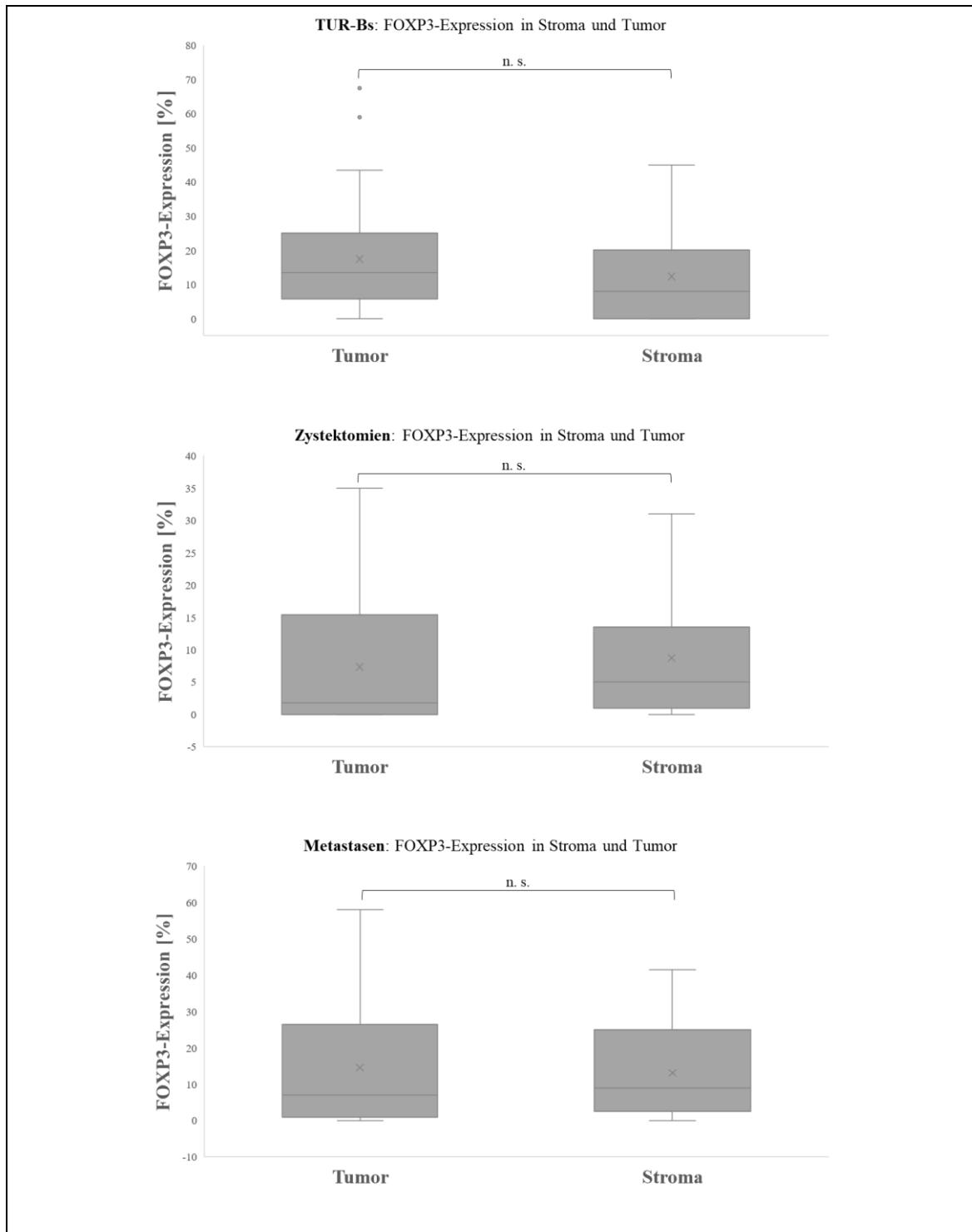


Abbildung 41: FOXP3-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. In allen drei Beispielen fand zwischen den beiden Kompartimenten ein Mittelwerts-Vergleich mittels einem Whitney-U-Test statt.

Die FOXP3-Expression wies zwischen TUR-B-, Zystektomie- und Metastasen-Gewebe keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kompartimenten auf.

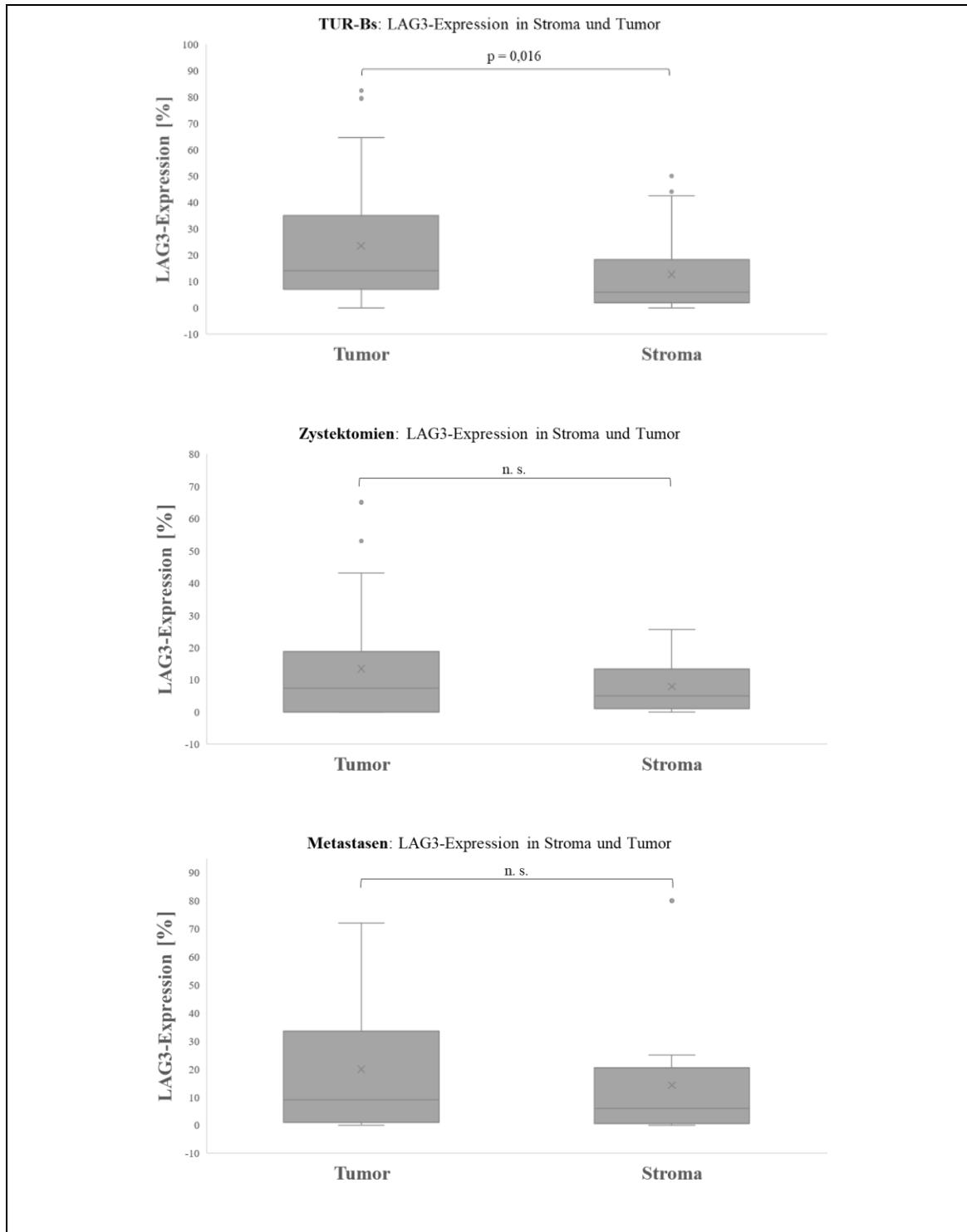


Abbildung 42: LAG3-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. In allen drei Beispielen fand zwischen den beiden Kompartimenten ein Mittelwerts-Vergleich mittels einem Whitney-U-Test statt.

Die LAG3-Expression wies in den TUR-B einen signifikanten Unterschied zwischen den 37 Stroma- ($M = 12,67$; $SD = 14,81$) und 45 Tumor-Anteilen der Proben ($M = 23,5$; $SD = 23,41$) auf, und zwar war diese im Tumor-Kompartiment signifikant höher als im Stroma; $z = -2,4$, $p = 0,016$. In den Zystektomien und Metastasen ließ sich keine Signifikanz nachweisen.

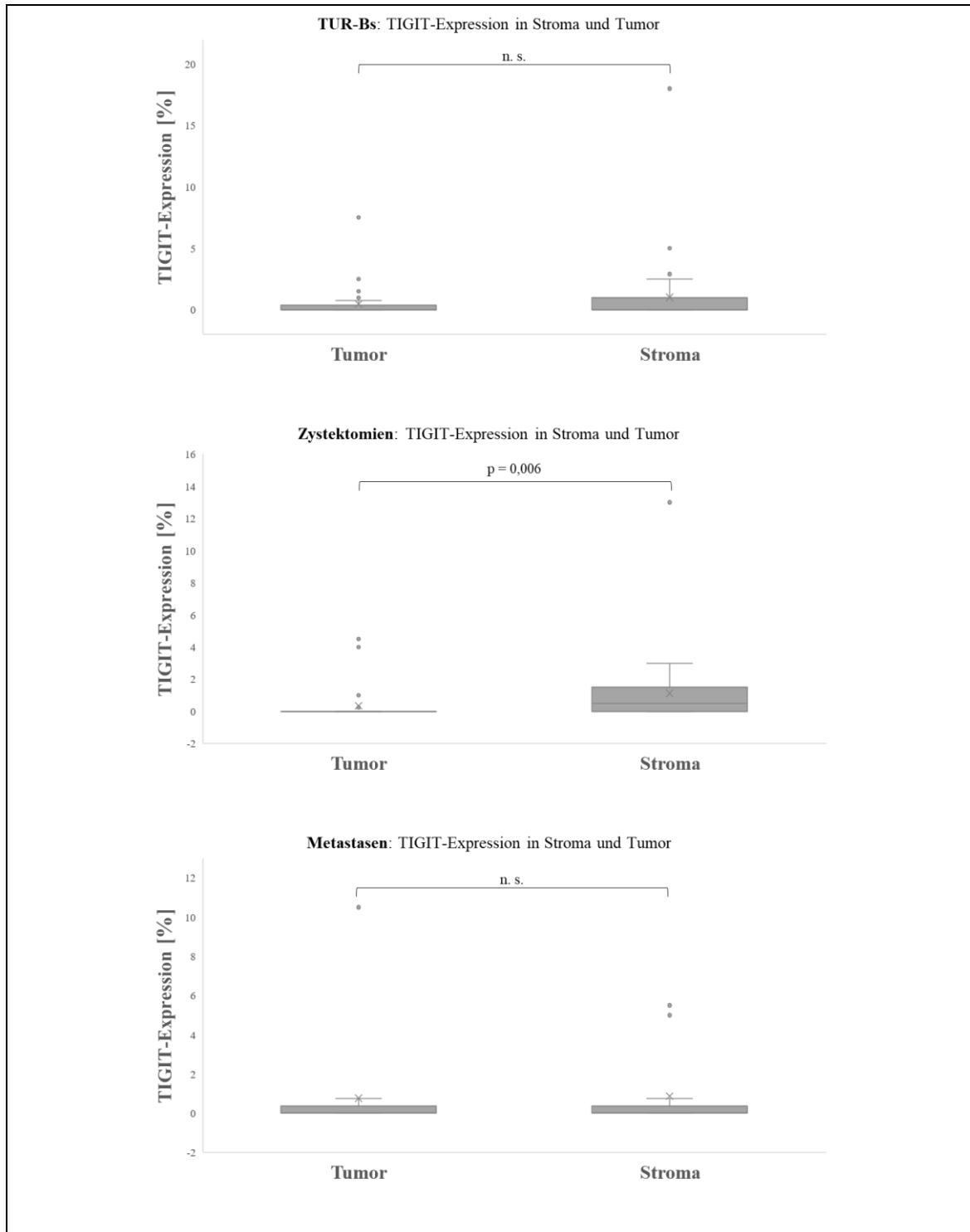


Abbildung 43: TIGIT-Expression im Tumor- und Stroma-Kompartiment, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. In allen drei Beispielen fand zwischen den beiden Kompartimenten ein Mittelwerts-Vergleich mittels einem Whitney-U-Test statt.

TIGIT hingegen wies in den TUR-B und Metastasen keine Signifikanz auf, dafür aber in den Zystektomien: hier war die TIGIT-Expression signifikant höher in den 30 Stroma-Anteilen ($M = 1,12$, $SD = 2,38$) als in den 28 Tumor-Anteilen der Proben ($M = 0,36$, $SD = 1,1$); $z = -2,769$, $p = 0,006$. Generell wies TIGIT eine eher geringe Expression in unserer Kohorte auf.

Die PD-L1 Auswertung erfolgte anhand der aktuell praxisrelevanten Scoring-Systeme: dem Immune-cells-Score (IC-Score) und Combined positivity score (CPS). Für beide Scoring Systeme wurden Boxplots erstellt, in diesen sind die Daten jeweils getrennt für die drei Eingriffstypen, TUR-B, Zystektomien und Metastasen, abgebildet. Auch hier fand zwischen den Eingriffstypen ein Mittelwerts-Vergleich mittels Whitney-U-Test statt.

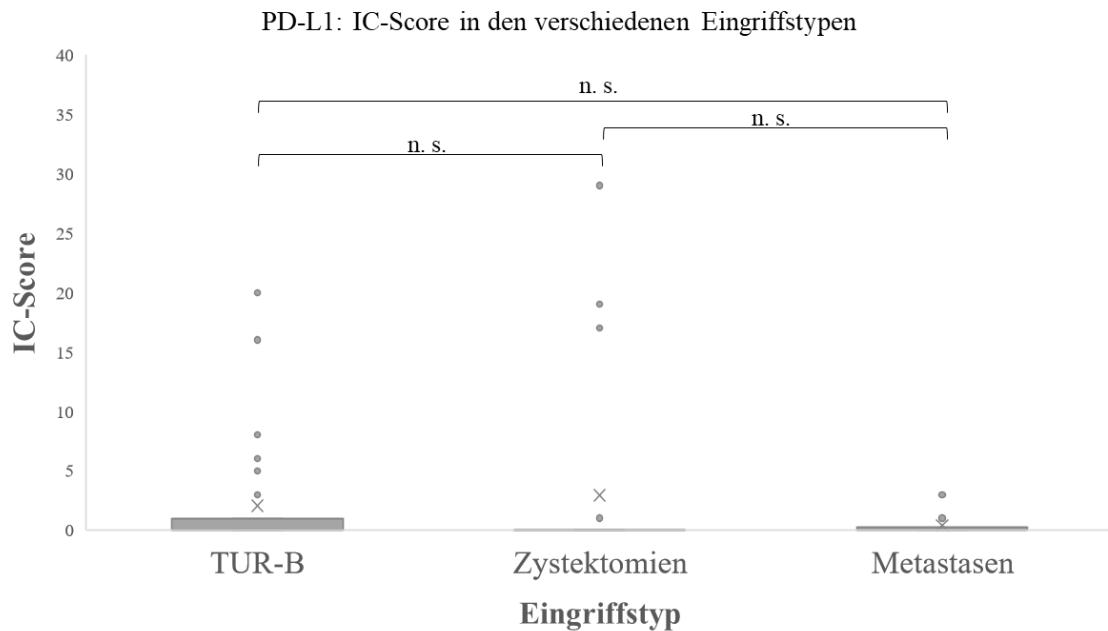


Abbildung 44: PD-L1-Expression, IC-Score, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. Für den Mittelwerts-Vergleich zwischen diesen wurde ein Whitney-U-Test verwendet.

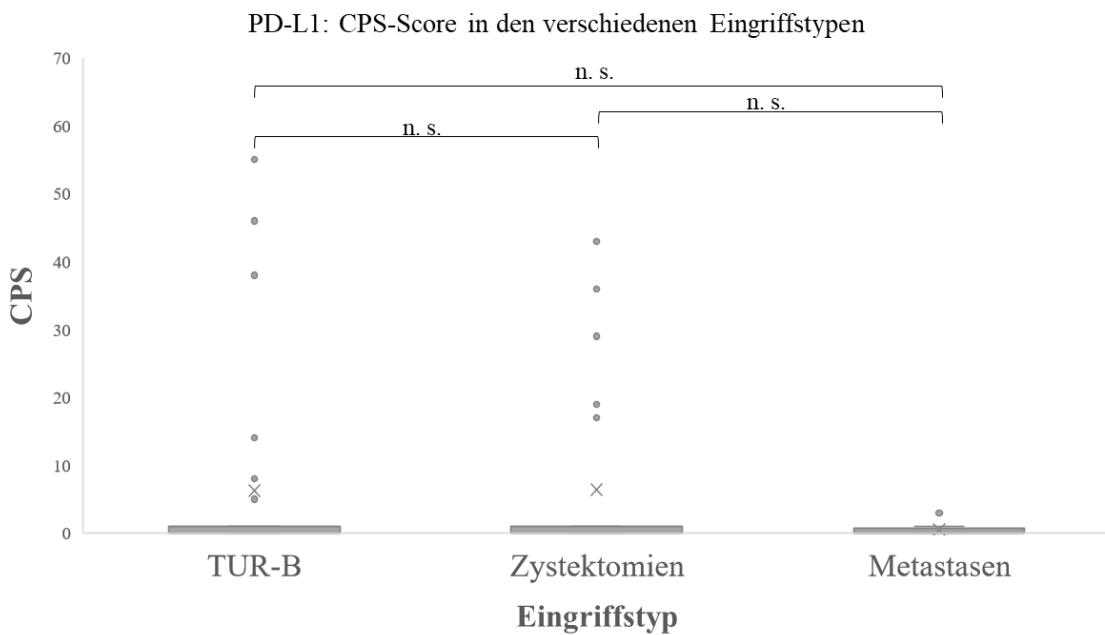


Abbildung 45: PD-L1-Expression, CPS, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. Für den Mittelwerts-Vergleich zwischen diesen wurde ein Whitney-U-Test verwendet.

Sowohl bei Verwendung des IC- als auch des CPS-Scores zeigte sich die PD-L1 Expression in unserer Kohorte eher als gering mit einigen stark positiven Ausreißern. Auffällig war hier, dass diese im Vergleich zu den TUR-B und Zystektomien in dem Eingriffstyp der Metastasen vermindert vorlagen. In den Mittelwerts-Vergleichen zwischen den Typen ließ sich keine Signifikanz nachweisen.

Um in Deutschland den PD-L1 Antagonisten Atezolizumab als Erstlinientherapie bei fortgeschrittenem bzw. metastasiertem Urothelkarzinom einsetzen zu können, muss ein IC-Score von mindestens 5% erreicht werden und eine Cisplatin-Eignung darf nicht gegeben sein (AWMF 2020). In den vier Therapiegruppen unserer Kohorte erreichen in der ICI-Gruppe zwei von 19, in der NAC-Gruppe fünf von 16, in der AC-Gruppe null von fünf und in der Palliativen-Gruppe fünf von insgesamt 20 Patienten diesen *Cut-off*-Wert (insgesamt 20% [12/60 Proben]). Beim CPS liegt der Cut-off, um Pembrolizumab im gleichen Szenario einsetzen zu dürfen, bei 10. Dieser Wert wird in der ICI-Gruppe bei drei von 19, in der NAC-Gruppe bei fünf von 16, in der AC-Gruppe bei keinem und in der Palliativen-Gruppe bei vier von 20 Patienten unserer Kohorte erreicht (insgesamt 23% [14/60 Proben]). Insgesamt erreichten acht Patienten unserer Kohorte sowohl den Cut-off des IC-Scores als auch den des CPS (insgesamt 13% [8/60 Proben]). Ebenfalls acht Patienten überschritten jeweils nur einen der Werte (13% [8/60 Proben]), jeweils vier den Cut-off des IC-Score bzw. den des CPS (jeweils ca. 7% [4/60 Proben]). 44 Patienten wiesen weder einen IC-Score von 5% noch einen CPS von 10% auf (73% [44/60 Proben]).

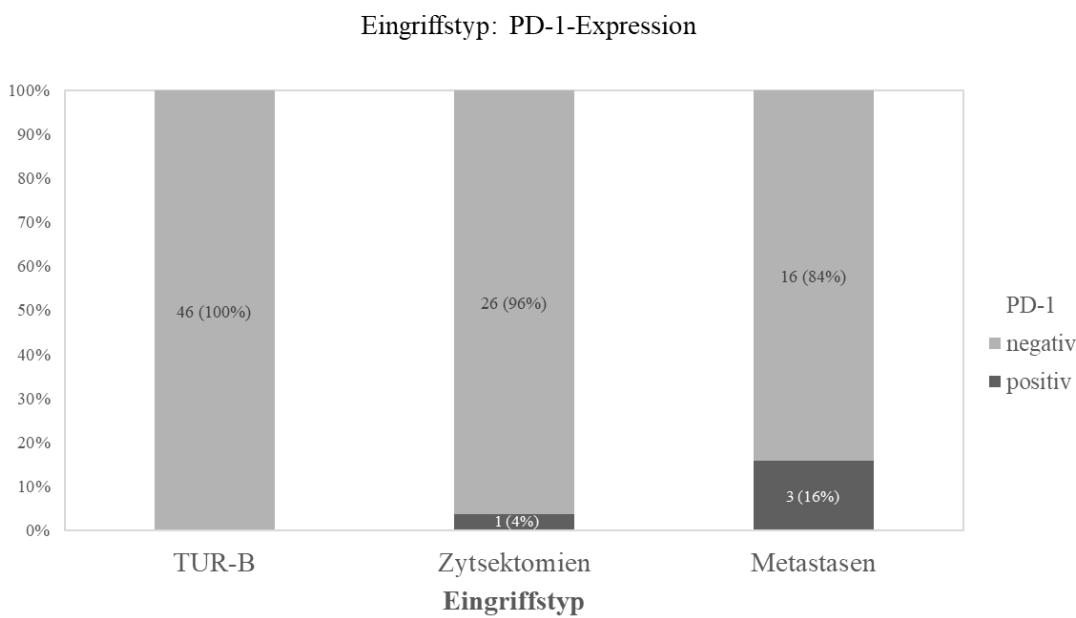


Abbildung 46: PD-1-Expression, getrennt dargestellt für die Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. In den Säulen sind die Anzahlen der zugehörigen Cores angegeben.

Im Falle von PD-1 wurden die *cores* nach den im Material und Methode Teil („2.4 Immunhistochemische Färbungen und Auswertungen“) erwähnten Kriterien in positiv und negativ eingeteilt. In den TUR-B waren sämtliche *cores* negativ, in den Zystektomien lediglich einer und in den Metastasen nur drei *cores* positiv. Da hier nur wenige *cores* ($n = 19$) vorlagen, machten diese drei aber doch 15% aus. Zusammengefasst war die PD-1-Expression in unserer Kohorte also gering.

3.6.3. Analyse der Proliferationsrate

Zur Analyse der Proliferationsrate in unserer Kohorte wurde die Expression des Ki67-Proteins herangezogen. In den letzten Jahren hat dies insbesondere in der Tumorforschung an Bedeutung zugewonnen, eine hohe Proliferationsrate hat oft einen Einfluss auf die Prognose und den Verlauf der Erkrankung.

Auf Grund dieses steigenden klinischen Interesses wurde die Proliferationsaktivität in unserer Kohorte ebenfalls erhoben. Die Ki67-Expression wird als Prozentsatz, in Bezug auf die gesamte Zahl der Tumorzellen, angegeben. In der folgenden Abbildung ist diese in Form von Boxplots, getrennt für die Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen dargestellt. Eine Korrelation zu den klinischen Verlaufsdaten der Kohorte sollte in Zukunft folgen.

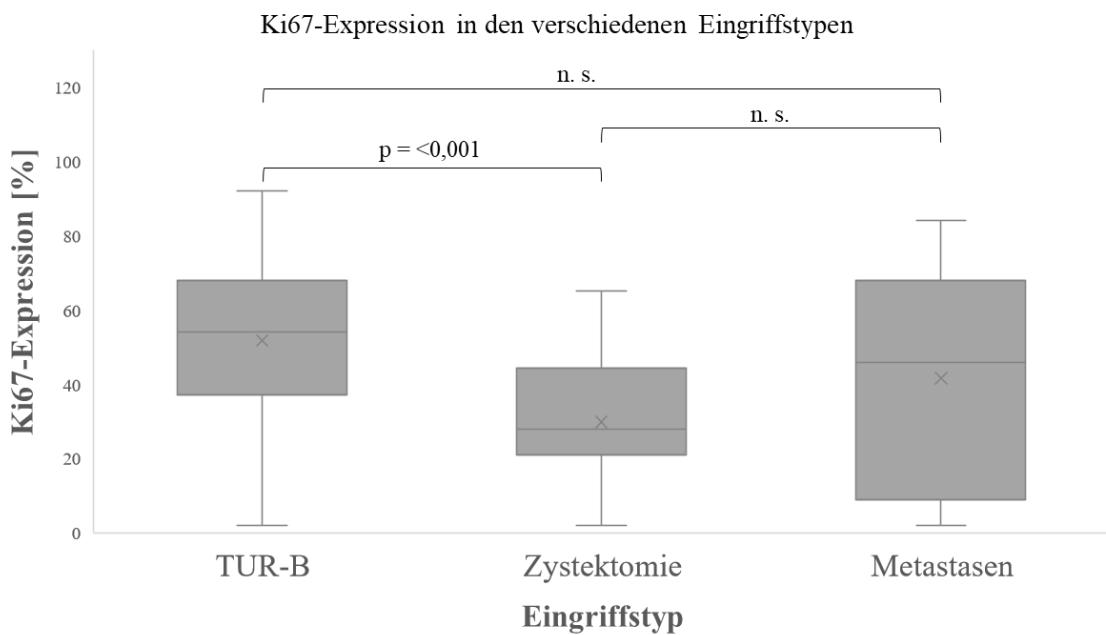


Abbildung 47: Ki67-Expression in den drei Eingriffstypen. In Form von Boxplots, getrennt dargestellt für die drei Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Metastasen. Zwischen diesen fand ein Mittelwerts-Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben statt.

Im Vergleich zwischen den Gruppen fand sich lediglich zwischen den TUR-B und den Zystektomien ein signifikanter Unterschied in der Ki67-Expression. Die Ki67-Expression war in den 45 TUR-B-Proben ($M = 51,83$, $SD = 21,93$) signifikant höher als in den 28 Zystektomie-Proben ($M = 29,91$, $SD = 18,56$); $t(71) = 4,39$, $p = <0,001$. Generell lag die höchste mittlere Expression und somit Proliferationsrate in den TUR-B ($M = 52\%$), gefolgt von den Metastasen ($M = 42\%$) und den Zystektomien an letzter Stelle ($M = 30\%$), vor. In den Metastasen zeigte sich dabei die größte Streuung der Werte.

3.7. Untersuchung prädiktiver Biomarker für die Neoadjuvante Chemotherapie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und mögliche Identifizierung prädiktiver Biomarker, die das Therapieansprechen für bereits etablierte Therapiemethoden vorhersagen könnten, an der Kohorte der am UKD uroonkologisch behandelten Patienten. Wir haben hier zunächst die Kohorte der neoadjuvant behandelten Patienten näher betrachtet ($n=18$).

Hierzu wurden die Patienten je nach Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie in drei Gruppen unterteilt. Für diese Unterteilung wurden die pTNM-Klassifikationen vor und nach der neoadjuvanten Chemotherapie, also in den TUR-B und den Zystektomien, herangezogen. Zur Gruppe 1 wurden die Patienten zugeteilt, die in den Zystektomien, also nach der Therapie, eine

komplette Remission erreichten, dementsprechend ein Stadium von ypT0 N0 M0 vorwiesen. Zur Gruppe 2 zählten die Patienten mit moderatem Ansprechen. Dieses haben wir als ein Stadium von ypTa oder ypT1, also dem weiteren Vorliegen eines exophytisch, nicht infiltrativen Tumors, oder einem Stadium von ypTis, also dem Vorliegen eines Carcinoma in situ, klassifiziert. In Gruppe 3 wurden die Patienten mit schlechtem Ansprechen zugeteilt. Dieses haben wir definiert als ein Stadium von ypT2 oder höher sowie dem Vorliegen sämtlicher lymphonodaler (pN) oder anderwärtiger Metastasen (M).

Tabelle 19: Gruppeneinteilung nach pTNM-Stadium

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
ypT0 N0 M0	ypTa/pTis/pT1 N0 M0	\geq ypT2 N+ M+
5 Patienten	5 Patienten	8 Patienten

Zwischen diesen Gruppen wurde die Expression der drei bioinformatisch ermittelten Gene TERT, NECTIN4 und TROP2 sowie, aus klinischem Interesse, von dem Proliferationsmarker Ki67 in den TUR-B Proben der Patienten, also vor Erhalt der Chemotherapie, verglichen. In den folgenden Abbildungen sind diese Daten in Form von Boxplots dargestellt, die genauen Auswertungsmethoden der einzelnen Marker sind dem Abschnitt „2.4. Immunhistochemische Färbung und Auswertung“ des Material-und-Methode-Teils zu entnehmen.

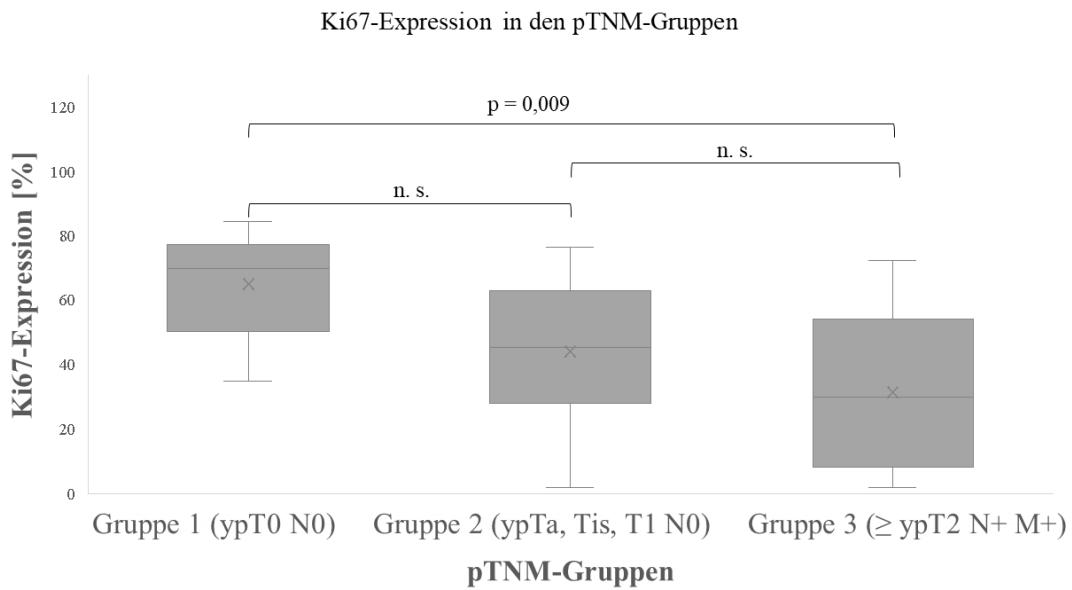


Abbildung 48: Ki67-Expression in den pTNM-Gruppen. In Form von Boxplots, getrennt dargestellt für

die anhand der pTNM-Klassifikation eingeteilten Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3. Zwischen diesen pTNM-Gruppen fand ein Mittelwerts-Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben statt.

Im Falle der Ki67-Expression, also der Proliferationsrate, war eine stetige Abnahme mit zunehmend schlechterem Ansprechen auffällig. Die Gruppe mit dem besten Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie, also Gruppe 1, wies vor Erhalt der Therapie die höchste mittlere Proliferationsrate auf ($M = 65,2\%$), gefolgt von der Gruppe mit dem moderaten Ansprechen ($M = 44\%$) und der Gruppe mit dem schlechten Ansprechen an letzter Stelle ($M = 31,5\%$). Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 ließ sich außerdem ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen: Die Ki67-Expression war in den 5 Cores der Gruppe 1 ($M = 65,2$; $SD = 18,3$) signifikant höher als in den 16 Cores der Gruppe 3 zugehörigen Patienten ($M = 31,5$; $SD = 23,34$); $t(19) = 2,94$; $p = 0,009$. Das Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie war in unserer Kohorte als umso besser, je höher die vor der Therapie bestimmte Proliferationsrate war. Ki67 könnte sich somit als ein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie gut eignen.

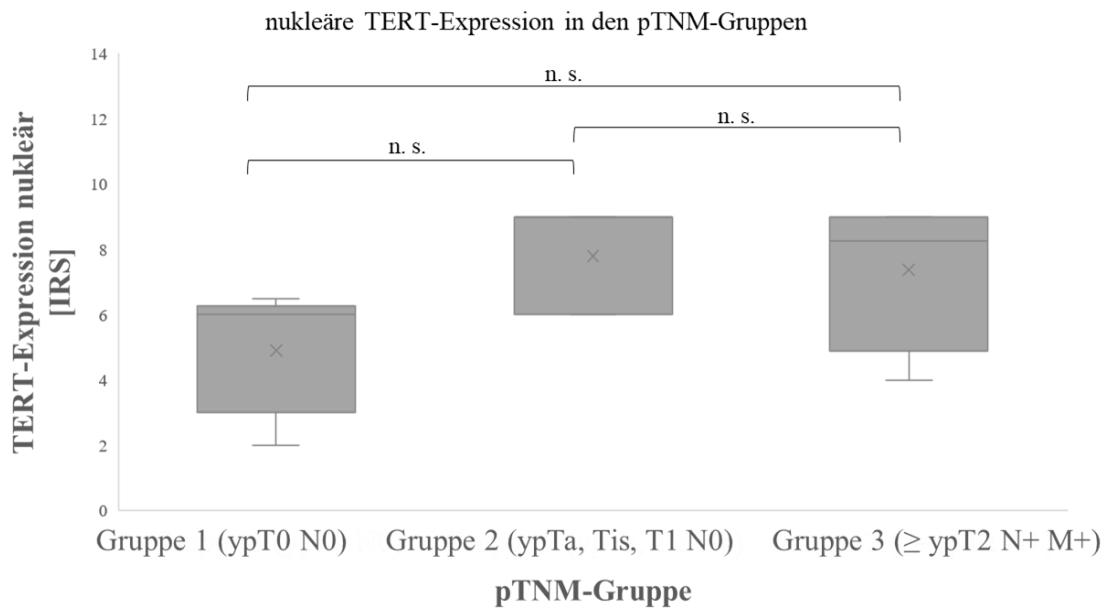


Abbildung 49: **Nukleäre TERT-Expression in den pTNM-Gruppen.** In Form von Boxplots, getrennt dargestellt für die anhand der pTNM-Klassifikation eingeteilten Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3. Zwischen diesen pTNM-Gruppen fand ein Mittelwerts-Vergleich mittels Whitney-U-Test statt.

Für die nukleäre TERT-Expression ließ sich kein signifikanter Unterschied in den drei Gruppen nachweisen. Es ließ sich dennoch ein aufsteigender Trend erahnen: je höher die TERT-Expression, desto schlechter schien das Ansprechen zu sein. Dies würde auch mit dem Kenntnisstand aktueller Publikationen zur TERT-Expression im Urothelkarzinom der Harnblase übereinstimmen, im Abschnitt 4.2.1. der Diskussion wird hier genauer drauf eingegangen. Zur Validierung dieser Annahme sollte dies in einer größeren Kohorte überprüft werden.

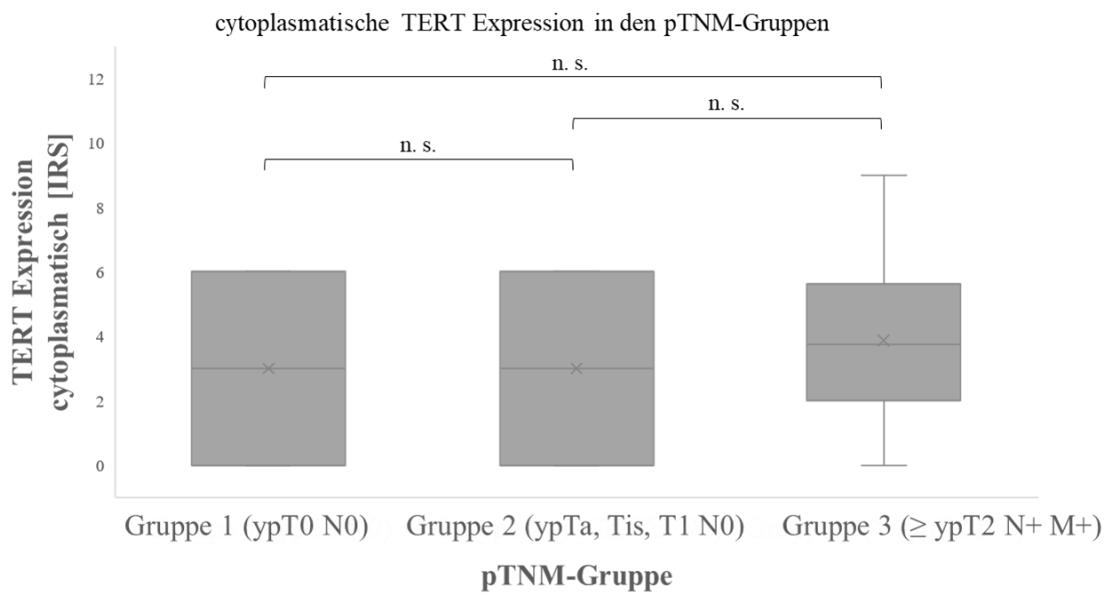


Abbildung 50: Cytoplasmatische TERT-Expression in den pTNM-Gruppen. In Form von Boxplots, getrennt dargestellt für die anhand der pTNM-Klassifikation eingeteilten Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3. Zwischen diesen pTNM-Gruppen fand ein Mittelwerts-Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben statt.

Die cytoplasmatische TERT-Expression wies keinen erkennbaren oder signifikanten Unterschied zwischen den pTNM-Gruppen auf.

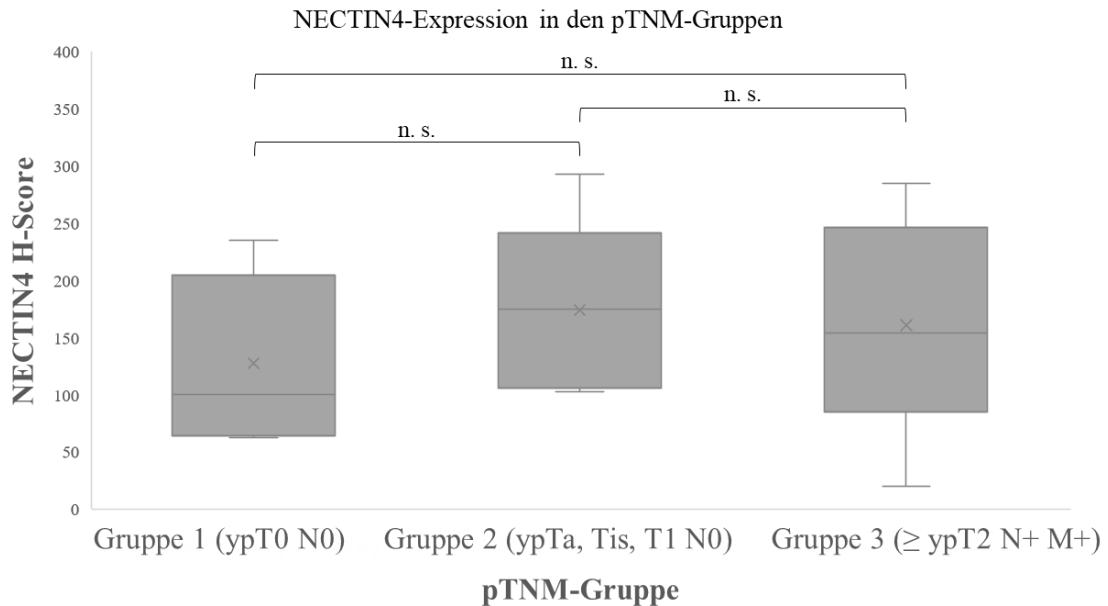


Abbildung 51: NECTIN4-Expression in den pTNM-Gruppen. In Form von Boxplots, getrennt dargestellt für die anhand der pTNM-Klassifikation eingeteilten Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3. Zwischen diesen pTNM-Gruppen fand ein Mittelwerts-Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben statt.

Gleiches trifft für die NECTIN4-Expression zu, es lag kein Zusammenhang zwischen dieser und dem Ansprechen vor.

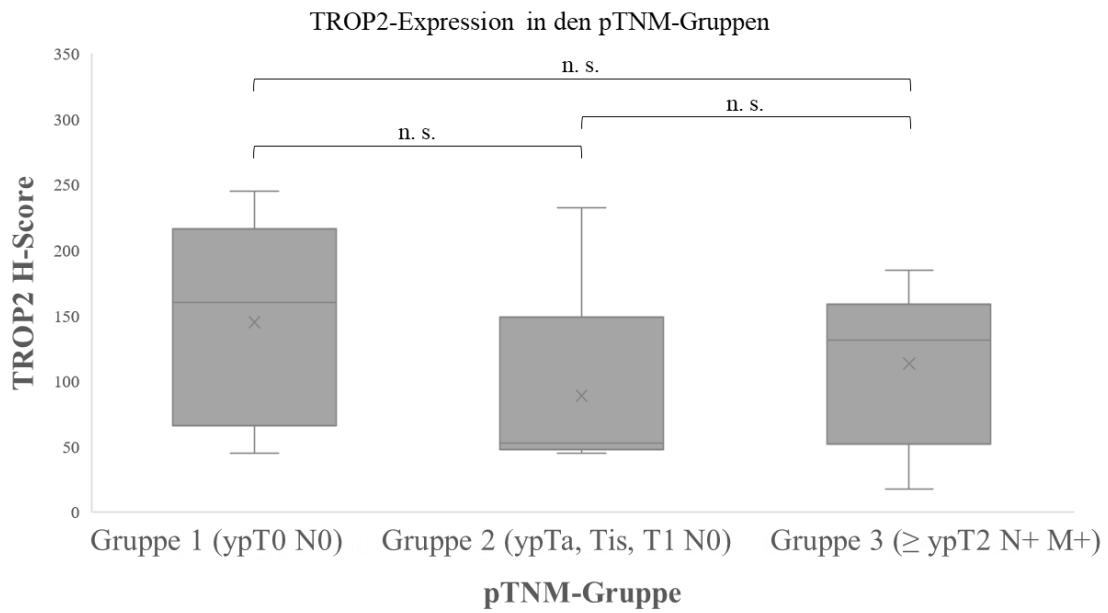


Abbildung 52: TROP2-Expression in den pTNM-Gruppen. In Form von Boxplots, getrennt dargestellt für die anhand der pTNM-Klassifikation eingeteilten Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3. Zwischen diesen pTNM-Gruppen fand, je nachdem ob eine Normalverteilung gegeben war oder nicht, ein Mittelwerts-Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben oder mittels Whitney-U-Test statt.

Auch TROP2 scheint kein geeigneter prädiktiver Marker für das Ansprechen zu sein, es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen.

Zusammengefasst scheinen die NECTIN4-, TROP2- und cytoplasmatische TERT-Expression also keinen prädiktiven Wert für das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie zu haben. Im Falle der nukleären TERT-Expression ließ sich zwar ein Trend erkennen, aber keine Signifikanz nachweisen. Die Ki67-Expression hingegen stellte sich als ein gut geeigneter prädiktiver Marker dar, der durch die einfache Anwendung der immunhistochemischen Färbungen die klinische Routine unterstützen könnte. Auf Grund der kleinen Kohorte sollte dies mit größeren Fallzahlen nochmals bestätigt werden.

3.7.1 Überlebensanalyse der pTNM-Gruppen

Auch für die festgelegten pTNM-Gruppen wurde eine Überlebensanalyse durchgeführt, dargestellt mittels Kaplan-Maier-Kurven. Es wurde außerdem ein Log-Rank-Test angewendet, um zu ermitteln, ob zwischen diesen drei Gruppen signifikante Unterschiede bezüglich des Überlebens vorliegen. Hier ließ sich zwar der Trend erkennen, dass das Überleben von Gruppe eins zu drei stetig sinkt, es konnte aber aufgrund der kleinen Fallzahlen keine signifikanten Überlebensunterschiede nachgewiesen werden.

Gesamtüberleben nach pTNM Gruppen

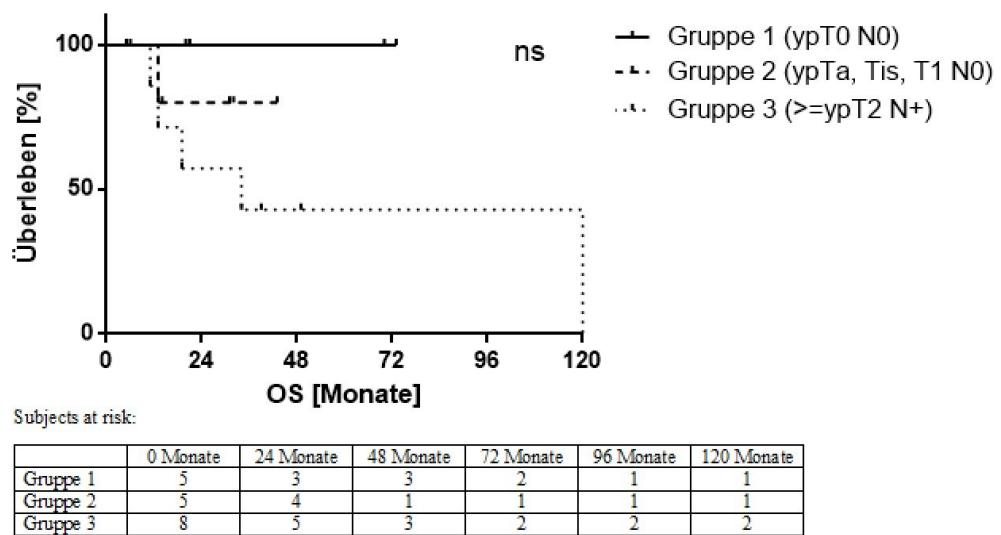


Abbildung 53: **Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der pTNM Gruppen 1-3.** Zwischen den Gruppen fand ein Mittelwerts Vergleich mittels Log-Rank-Test statt. Unter der Kurve sind zusätzlich die subjects-at-risk dargestellt. Für die X-Achse wurde ein Maximum von 120 Monaten festgelegt.

4. Diskussion

In der Behandlung des Urothelkarzinoms der Harnblase ist die Cisplatin-basierte Chemotherapie seit Jahrzehnten die standardhaft durchgeführte Therapie. Unter anderem durch die fortschreitende Entwicklung von Resistzenzen ist die therapeutische Wirkung trotz eines initialen Tumoransprechens bei mehr als 40% der Patienten und einer Stabilisierung des weiteren Krankheitsverlaufs bei insgesamt etwa 60 -80% der Patienten zeitlich begrenzt. Eine Entwicklung von neuen Therapieansätzen, die eine Alternative zur Chemotherapie darstellen könnten, ist also dringend erforderlich. Neue Behandlungsansätze, wie der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren, haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. In jüngster Zeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine kombinierte Behandlung mittels Immuncheckpoint-Inhibitor und Antikörper-Wirkstoffkonjugat einer platin-basierten Chemotherapie überlegen ist.

Ein neuer möglicher alternativer Therapieansatz könnte eine CAR-T-Zell-Therapie darstellen. Im Gegensatz zu den oben angeführten Beispielen, deren Wirkdauer limitiert ist, besteht hier die Möglichkeit einer langfristigen Tumorkontrolle. Zum Teil sind die CAR-T-Zellen noch Monate oder sogar Jahre nach initialer Infusion im Blut des Patienten nachweisbar und können in diesem Zeitraum dementsprechend auf neu entstehende Tumorzellen reagieren. Ein „Abwehrmechanismus“ gegen mögliche Rezidive bleibt also auch nach erfolgter Therapie länger bestehen. In dieser Arbeit sollten neue, möglichst tumorspezifische, Zielmoleküle für eine CAR-T-Zell-Therapie des Urothelkarzinoms identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte in mehreren Schritten: als erstes wurden mögliche Kandidaten bioinformatisch ermittelt, darauf folgten Analysen im Zellmodell, auf mRNA-Ebene und schließlich über immunhistochemische Färbungen an manuell erstellten *Tissuemicroarrays* (TMA), auf Protein-Ebene. Das Gewebe dieser TMAs stammte von einer Kohorte Patienten, die am UKD auf Grund eines muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms in Behandlung waren.

Außerdem war in dieser Arbeit die Untersuchung möglicher prädiktiver Biomarker, die ein Ansprechen auf eine Chemotherapie oder andere Systemtherapien vorhersagen könnten, von Interesse. Konkret wurde zunächst untersucht, ob sich das Therapieansprechen der Gruppe von Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, mit der Expression verschiedener Marker in Verbindung bringen lässt.

Ein weiteres Ziel bestand in der molekularen Charakterisierung der Kohorte durch die Bestimmung molekularer Subtypen, Erhebung der Expression von Immuncheckpoint-Proteinen sowie Bestimmung von Proliferationsaktivität und Inflammation über weitere immunhistochemische Färbungen.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1. In silico Analysen zur Identifikation neuer Kandidaten für Antitumortherapien

In dieser Arbeit wurde eine erste Auswahl von möglichen Kandidaten für die CAR-T-Zell-Therapie aus einem Vergleich von Transkriptomdaten der kommerziell erhältlichen benignen urothelialen Kontrollzelllinie HBLAK (Hoffmann *et al.* 2016) und den fünf Urothelkarzinom-Zelllinien RT112 (Marshall *et al.* 1977), J82 (O'Toole *et al.* 1978), T24 (Bubeník *et al.* 1973), VMCUB1 (Williams 1980) und UMUC3 (Grossman *et al.* 1986) gewonnen. Hier konnten durch eine Auswertung der entsprechenden Daten aus RNA-Sequenzierungen 200 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die eine höhere Expression in den Tumorzelllinien als in HBLAK aufwiesen. Durch eine Prüfung der intrazellulären Lokalisation der korrespondierenden Proteine, und einer Auswahl lediglich der Proteine, die eine Expression auf der Plasmamembran zeigten, wurde diese große Anzahl reduziert. Proteine mit einer Expression auf der Plasmamembran eignen sich besser als *Targets* für eine CAR-T-Zell-Therapie. Um die intrazelluläre Lokalisation zu prüfen, wurden öffentliche Datenbanken verwendet, und zwar The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) und Genecards (<https://www.genecards.org/>).

Bei der im initialen Vergleich der Transkriptomdaten als Normalkontrolle eingesetzten Zelllinie HBLAK handelt es sich um eine spontan immortalisierte Uroepithelzelllinie. Neben einer vorliegenden C228T-TERT-Promotor-Mutation und wenigen Veränderungen des Karyotypen wie einer 9p21-Deletion weist diese keine Urothelkarzinom-typischen Veränderungen auf, dennoch sind die oben genannten Veränderungen charakteristisch für ein Urothelkarzinom im Frühstadium. Die Reaktion der Zelllinie auf zytotoxische Behandlungen ähnelt dennoch der von normalen Urothelzellen und insbesondere die Gene, die zu den am häufigsten veränderten im Urothelkarzinom zählen, sind in der HBLAK-Zelllinie unverändert (Hoffmann *et al.* 2016). HBLAK spiegelt somit zu einem großen Teil den Phänotyp gesunder Uroepithelien wieder und eine gute Eignung als Normalkontrolle scheint somit gegeben zu sein. Wie oben genannt muss eine immobilisierte Zelllinie jedoch Veränderungen aufweisen, die sie von wirklichen gesunden bzw. normalen Uroepithelien unterscheidet. Der Einsatz von HBLAK als Normalkontrolle kann also durchaus auch kritisch betrachtet werden, das Einbeziehen einer zweiten Normalkontrolle in diesen initialen Vergleich mit fünf Urothelkarzinom-Zelllinien hätte unter Umständen in noch spezifischeren Ergebnissen resultieren können. Weitere Vorteile von HBLAK u. a. gegenüber anderer Zellkulturmodellen ist die unbegrenzte Lebensdauer und somit gesicherte Verfügbarkeit.

Die verwendeten Tumor-Zelllinien spiegeln das Spektrum der Erkrankung zwar adäquat wieder, dennoch wäre auch hier eine Ausweitung des Vergleichs mit den Tumor-Zelllinien auf mehr als fünf Zelllinien denkbar gewesen.

Aus einer *in silico* Analyse von öffentlich zugänglichen, aus Patientengewebe gewonnenen, Daten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) wurden weitere Kandidaten identifiziert. TCGA wurde im Jahre 2006 ins Leben gerufen und erweitert mittels öffentlicher Förderungen stetig seinen Datensatz. Zu diesem zählen neben Genomen, Transkriptomen und Proteomen unterschiedlichster Entitäten u. a. auch die klinischen Daten der Probanden. Ziel des TCGA ist es, einen Katalog mit den entscheidenden molekularen Veränderungen zu erstellen, die für die Krebsentstehung verantwortlich sind. Durch dieses große Bestreben und das Bereitstellen dieser Datensätze hat TCGA in einem großen Maß zur onkologischen Forschung beigetragen (Yang *et al.* 2020). Diverse Studien arbeiteten bereits mit diesem Datensatz, um z. B. tumorspezifische Marker in den unterschiedlichsten Entitäten zu ermitteln oder eine Vielzahl weiterer Fragestellungen zu beantworten (Weinstein *et al.* 2013).

In dieser Publikation wurden die vom TCGA bereitgestellten Transkriptomdaten von 427 Tumorgeweben mit 19 Normal-Blasengeweben verglichen. Auch in diesem Fall liegen somit bedauerlicherweise deutlich weniger Transkriptomdaten aus Normalkontrollen als aus Tumorgeweben vor. Begründen lässt sich dies durch die geringe Verfügbarkeit von durchweg gesundem Normalgewebe zu Forschungszwecken. In Abschnitt 4.1.3. wird auf diese Problematik sowie mögliche Lösungsansätze weiter eingegangen.

Das weitere Vorgehen verlief hier analog zur ersten Auswahl, es wurden die gleichen Datenbanken benutzt, um die korrespondierenden Proteine mit einer Expression auf der Plasmamembran zu identifizieren. Hier kam es bei einem der ermittelten Kandidaten, *TERT*, nachwirkend zu Problemen in der Beurteilbarkeit, da die in den Datenbanken angegebenen Lokalisationen nicht vollends mit den Quellen eben dieser übereinstimmten. Im Abschnitt 4.2.3 wird hierauf genauer eingegangen.

4.1.2 Quantitative Real-Time PCR

Die Validierung der *in silico* identifizierten Kandidaten erfolgte auf mRNA-Ebene mittels *real-time* PCR in Zelllinien und Geweben mit Gen-spezifischen Primern.

Die nach der reversen Transkription erfolgende quantitative *real-time* PCR, oder kurz qRT-PCR, ist ein äußerst sensitives Verfahren, um Gen-Expressionslevel zu bestimmen und wird in diesem Bereich weitläufig eingesetzt. In diesem Fall erfolgte die Quantifizierung über die Messung von Fluoreszenzsignalen, welche proportional zu der pro PCR-Zyklus entstandenen PCR-

Amplifikatmenge ansteigen. Wie der Name der Technik schon verrät, ist dies in „*real time*“, also in ständiger Überwachung der Amplifikation, möglich. Die tatsächliche Quantifizierung kann über zwei verschiedene Wege erfolgen, und zwar absolut oder relativ (Harshitha und Arunraj 2021). In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine relative Quantifizierung. Hier wird die gemessene Expression des Gens von Interesse mit der Expression eines anderen Gens verglichen und in Relation gestellt, zusätzlich fand bei der initialen Primer-Etablierung ein relativer Vergleich zu einer Standards-Verdünnungsreihe statt. Ideale Kandidaten für diese Vergleichs-Gene sind sogenannte „*housekeeping genes*“, also Gene, die für den Aufrechterhalt der zellulären Funktion entscheidend und somit möglichst konstant exprimiert sind. Je nach Fragestellung, experimentellen Bedingungen und untersuchtem Zelltypen sollten hier andere Gene zum Einsatz kommen (Andersen *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurde mit dem *housekeeping gene TBP* gearbeitet. *TBP* ist die Abkürzung für „*TATA-box-binding protein*“. Dieses ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID, und zwar die, die wie der Name schon verrät, die TATA-Box bindet. *TBP* spielt somit eine wichtige Rolle in der Initiierung der Transkription (The Human Protein Atlas - TBP). Die Eignung dieses Gens als Referenzgen bei der Fragestellung nach Unterschieden von Expression in gesundem und tumorösen Blasengewebe wurde bereits in diversen Studien verifiziert. So unter anderem von Smith *et al.*, diese untersuchten prospektive und retrospektive Kohorten von an Blasenkrebs erkrankten Patienten und untersuchten die Stabilität diverser Gene anhand drei verschiedener Algorithmen. *TBP* zeichnete sich in all diesen Algorithmen als beständig exprimierte Gen und somit als ein guter Referenzkandidat (Smith *et al.* 2020). Auch Ohl *et al.* untersuchten verschiedene mögliche Referenz-Gene bezüglich der Expressionsverhältnisse zwischen benignem und malignem Blasengewebe und ermittelten *TBP* als einen stabil exprimierten Anwärter (Ohl *et al.* 2006). Für die in dieser Publikation angestrebten Ermittlung möglichst tumorspezifischer Gene ist *TBP* folglich ein gut geeignetes Referenzgen.

4.1.3. *Tissue microarrays*

Für die Analyse der Expression auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbungen wurden im Rahmen dieser Arbeit *Tissue microarrays* erstellt, die das Gewebe unserer Kohorte von am UKD behandelten Patienten mit Urothelkarzinomen der Blase enthalten. Die Herstellung der TMAs erfolgte manuell mittels eines *Manual-Tissue-Arrayers*. Die Tumor-Areale der Donor-FFPE-Blöcke, welche ausgestanzt und in die Paraffin-TMA-Blöcke eingefügt werden sollten, auch zu bezeichnen als „*Regions of Interest*“ (ROI) wurden initial in Zusammenarbeit mit der Pathologie an den jeweiligen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten vormarkiert.

Tissue microarrays erlauben es, eine große Anzahl an Gewebeproben, simultan zu untersuchen. Die am häufigsten angewandte Methode des Screenings ist die Immunhistochemie (Voduc *et al.*

2008). Diese Technik macht es somit möglich, diagnostische oder prädiktive Biomarker schnell und auch kostengünstig zu screenen. Außerdem kann die interexperimentelle Variabilität vermieden werden, sowohl während des Färbe- als auch des Interpretationsprozesses (Kononen *et al.* 1998). Insbesondere im Bereich der Tumorforschung haben sich die *Tissue microarrays* in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug etabliert. Neben der Entdeckung neuer Biomarker für die personalisierte Medizin erlaubt dies auch eine schnelle Übertragung in den klinischen Einsatz (Voduc *et al.* 2008).

Alternative Hochdurchsatz-Methoden, die eine veränderte Expression bestimmter Gene bzw. Proteine untersuchen, sind z. B. DNA-Mikroarrays oder Techniken der Proteomik wie ein Protein-Microarray. TMAs weisen diverse Vorteile gegenüber diesen Methoden auf, beginnend mit dem benötigten Ausgangsmaterial. So benötigen z. B. DNA-Mikroarrays „*fresh frozen tissue*“, während für TMAs FFPE-Gewebe zum Einsatz kommt. Dieses ist die übliche Lagerungsmethode von sämtlichen chirurgisch gewonnenen Proben, außerdem sind Krankenhäuser dazu verpflichtet, dieses Gewebe mindestens 20 Jahre lang aufzubewahren (Voduc *et al.* 2008). Diese ist somit deutlich leichter verfügbar als das eingefrorene Gewebe. Häufig sind keine zusätzlichen Eingriffe möglich und das Gewebe stammt aus klinisch indizierten Operationen. Wie oben erwähnt ist die häufigste Technik, für die TMAs verwendet werden, die Immunhistochemie. Alternative Methoden, wie die oben erwähnten DNA- und Protein-Microarrays oder auch Sequenzierungen, setzen eine Homogenisierung und somit, einen zusätzlichen Arbeitsschritt, und eine Herauslösung aus der Morphologie des Gewebes voraus. Somit ist es anspruchsvoller „reine“ Tumorproben zu erhalten, während der Pathologe in den histologischen Auswertungen, die nicht tumorösen Anteile einfach unbeachtet lassen kann. Aber auch Fragestellungen, die sich auf die Tumorumgebung beziehen werden durch die Erhaltung der Morphologie in einem TMA möglich gemacht.

Das Anfertigen und Färben ganzer Schnitte, also für jeden FFPE-Gewebeblock eines jeden Patienten unserer Kohorte, wäre zwar eine mögliche Alternative zu der Erstellung der TMAs gewesen, hätte aber einen enorm großen Material- und Zeitaufwand mit sich gebracht. Durch die Anfertigung von TMAs werden in einem erheblichen Maße Ressourcen gespart.

Das Konzept der *Tissue microarrays* wurde erstmals 1986 von Hector Battifora beschrieben (Battifora 1986), dieser bezeichnete sie als „Multitumorgewebeblock“ und sah sie als kostengünstigen und schnellen Screening Methode für gewebespezifische monoklonale Antikörper vor. 1998 folgte von Juha Kononen die Erstellung des ersten *Tissue microarray* und Entwicklung eines funktionellen „*Tissue Arrayers*“, welcher die Herstellung von TMAs deutlich vereinfachte (Kononen *et al.* 1998). Der Aufbau von diesem ähnelt weitestgehend auch den heute noch verwendeten Geräten. Es bestand aus einer Stahl-Stanze mit einem Durchmesser von 600 µm,

gehalten in einer X-Y-Präzisionsführung, mit welcher die nachher zu füllenden *cores* des Empfängerblocks sowie die Gewebekerne aus den Spenderblöcken entnommen werden konnten. Über ein Mikrometer konnte diese Präzisionsführung die Stanze entlang ihrer eigenen Achse, und somit genaustens von *core* zu *core* auf dem Empfängerblock, bewegen. Auch in diese Arbeit haben wir einen solchen *Manual-Tissue-Arrayer* verwendet. Die Bedienung dieser Geräte kann schnell erlernt werden und erlaubt auch nicht geübten Personen eine sorgfältige, Gewebe-sparende und zeitlich effektive Anfertigung von TMAs. Nach der Einweisung in die Verwendung des Gerätes wurde der Doktorandin außerdem ermöglicht, den gesamten Prozess, vom Ausstechen der *cores* bis zum Färben der Schnitte, mit FFPE-Gewebeblöcken, die nicht mehr benötigt wurden, zu trainieren. So konnte, vor Verwendung des Patientengewebes unserer Kohorte, sichergestellt werden, dass die Technik ausreichend beherrscht wurde.

Manual-Tissue-Arrayer haben sich zwar in diversen Studien bewährt, benötigen aber, wie der Name schon verrät, Handarbeit. Daraufhin folgte die Entwicklung der halb- und vollautomatischen TMA-Systeme, der weite Einsatz dieser ist jedoch durch die hohen Anschaffungskosten begrenzt. Dennoch haben diese Systeme diverse Vorteile gegenüber der Manuellen Methode. Unter anderem setzen Zlobec *et al* in einer 2013 veröffentlichten Arbeit (Zlobec *et al.* 2013) einen solchen automatisierten Tissue-Arrayer (Grandmaster, 3DHistech) ein. Dieser benötigte 12 Sekunden für das Ausstanzen von einem *core* und der Übertragung in den Empfängerblock. In dieser Studie wurden zwei TMAs erstellt, diese enthielten insgesamt 420 *cores* mit einem Durchmesser von 1 mm, innerhalb von insgesamt 1,4 Stunden. Bei der hier vorgelegten Arbeit wurden insgesamt 222 *cores* ausgestanzt und übertragen, der zeitliche Aufwand betrug hier ca. dreieinhalb volle Arbeitstage. In dieser Zeit ist allerdings auch der Abgleich der vormarkierten Slides mit dem Spenderblock und das Auffinden der auszustanzenden Areale inbegriffen. Der Einsatz automatisierter *Tissue-Arrayer* führt dennoch zu einer deutlichen Zeitsparnis. Zlobec *et al* berichten außerdem von einer lediglich 2%igen Fehlerquote bei der Übertragung vom Spender- in den Empfängerblock, dieses Risiko scheint bei der manuellen Anfertigung deutlich höher.

Wie anfangs erwähnt wurden die Tumor-Areale der Donor-FFPE-Blöcke initial in Zusammenarbeit mit der Pathologie an den jeweiligen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten mittels eines Filz-Markers vormarkiert. Diese markierten HE-Schnitte wurden auf die Donor-Blöcke gelegt, um die Stanze in die richtige Position zu bringen. Auch in der ersten Beschreibung von Kononen wurde dies so durchgeführt (Kononen *et al.* 1998). Idealerweise sollten hier vor der Markierung von jedem Donorblock erneut HE-Schnitte angefertigt werden, um einer Verschiebung der Schichten oder der Tumor-Lokalisation in der Tiefe vorzubeugen. Aus zeitlichen und Ressourcen-sparenden Gründen haben wir in dieser Arbeit darauf verzichtet. Dadurch konnte trotz größter Bemühungen in manchen Fällen ein genaues Übereinstimmen der

Darstellung in den HE-Schnitten mit dem jeweiligen Donor-Block nicht gewährleistet werden. Wenn die Abweichung bereits zu grob erschien, musste die Beurteilung der Morphologie zum Teil erschwert an aktuelleren, Immunhistochemisch gefärbten Schnitten erfolgen. In der bereits oben erwähnten Studie von Zlobec *et al* (Zlobec *et al.* 2013) wurde auch hier ein anderer, moderner Ansatz gewählt. Die angefertigten HE-Schnitte wurden mittels eines Objektträgerscanners (Pannoramic P250, 3DHistech) eingescannt, digitalisiert und mit der *Pannoramic Viewer Software* (3DHistech) betrachtet und die ROI digital markiert. Die Markierung war hier bereits exakt in dem gewählten Durchmesser der *cores* möglich, die Auswahl der geeigneten Areale benötigt aber weiterhin die Expertise eines erfahrenen Pathologen. Der von Zlobec *et al* verwendete automatisierte *Tissue-Arrayer* erstellte zusätzlich eine Aufnahme von jedem eingefügten Spenderblock. Diese Aufnahmen konnten anschließend mit den markierten, digitalisierten Objektträgern überlagert werden. Dadurch wurde eine exaktere Übereinstimmung erzielt als bei dem manuellen Abgleich von Spenderblock und HE-Schnitt. Nach Betrachtung und Bestätigung der Markierungen erfolgte die Stanzung der Spenderblöcke.

Ein durchgängiges Vorliegen des Tumorgewebes, also auch in der Tiefe der markierten Areale, war in keinem Fall initial einsehbar. Bei einer *core* Tiefe von 3 mm, wie wir sie gewählt haben, kann es also vorkommen, dass nicht jeder Schnitt Tumorgewebe enthalten wird. So kann eine Stanze z. B. nach dem ersten Millimeter auch nur noch Paraffin umfassen. Dieses durch die 3-Dimensionalität des Gewebes bedingte Problem ist ein häufig angesprochener Kritik-Punkt an der Technik der TMAs. Auch bei bereits dünnem Spendergewebe, wie den aus Metastasen gewonnenen Biopsien, kommt dieses Problem auf (Hoos und Cordon-Cardo 2001). Um diesem bestmöglich entgegenzuwirken, wurden in diesen Fällen mehrere *cores* aus einem Tumorbereich gestanzt. Nach jedem Stanzen wurde begutachtet, ob der *core* Paraffin enthält. Wenn dies der Fall war, wurden diese in ihrer Höhe so zugeschnitten, dass beim Aufeinanderlegen der einzelnen Teile in einer 3 mm Säule des Empfänger-Blocks, die volle Höhe mit Gewebe ausgefüllt wurde. Durch ein Erhitzen des Paraffin-Blocks wurde ein Zusammenfügen der Fragmente erreicht.

Die Frage, ob die einzelnen *cores* der TMAs tatsächlich repräsentativ für das gesamte Gewebe des Spenderblockes sind, ist einer der am häufigsten diskutierten Kritikpunkte an der Technik. Insbesondere bei äußerst heterogenen Entitäten wird befürchtet, dass die Ergebnisse nicht das Proteinexpressionsmuster des gesamten Tumors widerspiegeln könnten (Simon und Sauter 2002). Auch das Urothelkarzinom der Blase ist für seine ausgeprägte intratumorale Heterogenität bekannt. U. a. konnten Schallenberg *et al* die Heterogenität der Entität bezüglich der molekularen Subtypen über immunhistochemische Färbungen aufzeichnen: in 12,5% der Fälle wiesen die analysierten Tumorzentren und die Tumorperipherie unterschiedliche Subtypen auf, in 24,6% der Fälle wurde bei zufälliger Auswahl der analysierten Areale ein ungleicher Subtyp festgestellt

(Schallenberg *et al.* 2023). Diese Heterogenität sollte somit sowohl in der Anfertigung als auch der Auswertungen der TMA berücksichtigt werden.

Häufig angesprochene Punkte sind hier sowohl die Anzahl der *cores*, die einem Spenderblock entnommen werden, als auch die Größe, bzw. der Durchmesser dieser. Die Anzahl der *cores*, die einen Fall darstellen sollen, variiert stark, einen Konsens gibt es bis heute nicht. Das FFPE-Gewebe unserer Kohorte wurde in drei unterschiedlichen Arten von Eingriffen gewonnen: TUR-B, Zystektomien und Biopsien von Metastasen. Für jeden bei einem Patienten vorliegenden Eingriff wurden zwei *cores* in die TMA eingebettet, die Anzahl konnte also zwischen 2-6 *cores* schwanken, je nachdem, welche Eingriffe für den Patienten vorlagen. In zwei der insgesamt 60 Fällen konnte, aufgrund von mangelndem Gewebe, nur ein *core* gefüllt werden. Durch diesen Aufbau war auch die Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Expression möglich. Diverse Studien diskutieren die oben angesprochenen Punkte, so zum Beispiel eine Veröffentlichung von Camp *et al* aus dem Jahre 2000 (Camp *et al.* 2000), die sich mit der repräsentativen Anzahl der *cores* beschäftigte: In dieser Studie wurden TMAs mit dem Gewebe von 38 Brustkrebs-Patienten erstellt und die Expression der Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Rezeptoren immunhistochemisch an 1 bis 10 *cores* analysiert. Die Färbungen dieser Proben wurden mit den Ergebnissen aus den vollständigen Gewebsschnitten verglichen. Camp *et al* kamen zu dem Ergebnis, dass bereits der Einsatz von zwei *cores* zu einer 95% Übereinstimmung mit der Analyse des gesamten Schnittes führt. Wenn die Anzahl der *cores* auf 5 erhöht wurde, führte dies zu einer Erhöhung der Übereinstimmung auf sogar 99,5%. Torhorst *et al* kamen in einer 2001 veröffentlichten Studie (Torhorst *et al.* 2001) sogar zu dem Ergebnis, dass die Verwendung von nur einem *core* ausreicht, um die gleichen Zusammenhänge zwischen Klinik und Expression der Biomarker zu reproduzieren, allerdings nur, wenn die Kohorte ausreichend groß ist. Auch hier wurden Brustkrebs-Biomarker untersucht, u.a. erneut der Östrogen- und Progesteronrezeptor. Bei der Analyse eines *cores* stimmten die Ergebnisse im Vergleich zur Analyse des gesamten Schnittes im Falle des Progesteronrezeptors zu 95%, in Falle des Östrogenrezeptors zu 75-81%, überein. Es zeigten sich also deutliche Unterschiede zwischen den Markern. Dies lässt vermuten, dass die repräsentative Anzahl der *cores* auch von den individuellen Expressionsmustern der untersuchten Marker abhängt. Ein Vergleich zwischen den TMA- und Gesamtschnitt-Analysen der von uns untersuchten Biomarker, speziell für das Urothelkarzinom, könnte in Zukunft also von Interesse sein.

Neben der Anzahl der repräsentierenden *cores* wird wie oben erwähnt auch der Durchmesser diskutiert, je größer der *core*, desto mehr Gewebeheterogenität kann abgebildet werden, aber desto höher ist auch der Gewebsverlust und der Materialaufwand. Je weniger *cores* auf eine TMA passen, desto mehr Schnitte müssen angefertigt und gefärbt werden, was wiederum auch direkt mit einem höheren Arbeitsaufwand verbunden ist. Ein größerer *core*-Durchmesser erlaubt

außerdem, insbesondere bei einer manuellen Erstellung der TMAs, die ROI verlässlicher zu erfassen. Dies ist insbesondere bei kleinen ROIs von Vorteil. Die am häufigsten eingesetzte Größe der *cores* ist 0,6 mm, aber auch 1, 1,5 oder 2 mm werden verwendet (Voduc *et al.* 2008). Für diese Arbeit wurde ein *core* Durchmesser von 1,5 mm gewählt, zum einen, da es sich beim Urothelkarzinom um stark heterogene Läsionen handelt. Zum anderen schnitt dieser Durchmesser bei unserer Abwägung von Gewebsverlust, Stabilität der Konstruktion, Arbeitsaufwand und der durch die Größe bedingte Anzahl anzufertigender TMAs am besten ab. Eskaros *et al* untersuchten in einer 2017 veröffentlichten Studie (Eskaros *et al.* 2017) konkret, welche *Core*-Größe die größte technische und analytische Genauigkeit für das Urothelkarzinom der Blase bieten kann. Hierzu wurden zwei TMAs erstellt, die Erste enthielt für jeden Fall drei *cores* mit einem Durchmesser von 0,6 mm, die Zweite zwei *cores* mit einem Durchmesser von 1 mm. Um die technische Genauigkeit zu analysieren, wurde mittels einem von Eskaros *et al* entwickelten Punktesystems bewertet, wie zuverlässig die ROI in einem *core* erfasst werden konnte. Anhand dieses Punktesystems wurden die *cores* in „verwertbar“ und „nicht verwertbar“ eingestuft. Ein *core* Durchmesser von 1 mm wies hier mit 94,2%, im Vergleich zu 84,9% bei einer *core* Größe von 0,6 mm, einen signifikant höheren Prozentsatz an verwertbaren Kernen auf. Die analytische Genauigkeit wurde unter anderem anhand der Übereinstimmung des prozentualen positiven Anteils des Markers Ki67, ermittelt über Immunhistochemie, in den TMAs und den ganzen Schnitten der korrespondierenden *cores* mittels eines Pearson-Korrelationskoeffizienten bewertet. Die Korrelation war hier bei den 1 mm großen *cores* ($t = 0,979; p = 0,004$) signifikant höher als in den 0,6 mm *cores* ($r = 0,478$). Eskaros *et al* schlussfolgerten somit, dass ein Durchmesser vom 1 mm bei der Erstellung von Urothelkarzinom-TMAs sowohl analytische als auch technische Vorteile gegenüber dem öfter eingesetzten 0,6 mm Durchmesser hat.

Wie oben erwähnt wurde in dieser Arbeit ein *core*-Durchmesser von 1,5 mm und ein Minimum an 2 *cores* pro Fall gewählt, je nach vorliegenden Eingriffen auch bis zu 6 *cores* pro Fall. Eingeordnet in die oben geschilderten Daten lässt sich somit von einer repräsentativ erstellten TMA ausgehen. In vielen Fällen ist die *core* Anzahl sogar größer als zwei, womit laut Camp *et al* (Camp *et al.* 2000) bereits eine Übereinstimmung von bis zu 95,5% im Vergleich zu den ganzen Schnitten erzielt werden kann. Durch die eher begrenzte Größe der Kohorte ist diese höhere Anzahl sicherlich sinnvoll. Ein Durchmesser von 1 mm hätte unter Umständen zwar ausgereicht, durch den höheren Durchmesser von 1,5 mm wurde bei der eher kleinen Fallzahl der Arbeitsaufwand allerdings nicht massiv erhöht. Außerdem ist anzunehmen, dass dies ebenfalls zu einer höheren technischen Genauigkeit geführt hat. Aus der oben geschilderten Datenlage lässt sich außerdem ziehen, dass weiterhin eine große technische Unsicherheit im Bereich des Aufbaus der *Tissue-microarrays* besteht. Sowohl die untersuchte Entität als auch die konkret analysierten Marker, sollten einen Einfluss auf den Aufbau der TMAs haben, um die größte analytische

Sicherheit zu gewährleisten. In vielen Bereichen fehlen hier allerdings noch die nötigen Daten, in Zukunft wären somit weitere Studien wünschenswert, die den idealen Aufbau der TMAs für unterschiedliche Organsysteme und Entitäten untersuchen.

In der Literatur, so unter anderem auch von Eskaros *et al* (Eskaros *et al.* 2017), wird außerdem die Anfertigung so genannter „Replikat-TMAs“ empfohlen. Dies bedeutet, dass jede TMA in mehrfacher Ausführung hergestellt werden sollte, um sowohl die Anzahl der *cores*, als auch die statistische Sicherheit zu erhöhen. Auch Torhorst *et al* (Torhorst *et al.* 2001) fertigten Ihre TMAs in Vierfacher Ausführung an und untersuchten die dadurch entstehende Reduzierung des Datenverlustes. Wenn nur eine TMA angefertigt wird und hier z. B. beim Schneideprozess ein *core* beschädigt wird oder umklappt, liegen für diesen keine Ergebnisse vor. Hat man jedoch Replikat-TMAs angefertigt ist es unwahrscheinlich, dass dieser Fehler am selben *core* nochmals unterläuft. Torhorst *et al* berichtet bei der Analyse einer einzelnen TMA von einem Anteil von 25-30% an nicht analysierbaren *cores*, durch die Verwendung von drei Replikat-TMAs konnte dieser auf 5-7% gesenkt werden. Der Einsatz der vierten Replikat-TMA brachte allerdings keine signifikante zusätzliche Reduzierung. Auf Grund von mangelnder Verfügbarkeit des Gewebes der Kohorte dieser Arbeit war eine solche Anfertigung bedauerlicherweise nicht durchführbar, hätte aber sicherlich zu einer Reduzierung des Datenverlustes führen können.

4.1.3. Immunhistochemische Färbung und Auswertung

Die Expressionsanalysen auf Protein-Ebene erfolgten in dieser Arbeit mittels immunhistochemischen Färbungen an den manuell erstellten TMAs. Durchgeführt wurden die insgesamt 17 Färbungen mittels des Ventana Benchmark XT und des Ventana Benchmark Ultra Systems. Die Verfügbarkeit dieser automatischen Färbesysteme ist eine große Bereicherung für diese Studie. Es wurden insgesamt 17 Färbungen an 7 TMAs durchgeführt, zusätzlich wurde von jedem TMA ein HE-Schnitt angefertigt. Das sind insgesamt 127 Objektträger, eine manuelle Färbung dieser hätte enorm viel Zeit in Anspruch genommen. Durch den, nach der initialen Etablierung der Antikörper, automatisierten Vorgang konnte diese Zeit anderwältig, so z. B. bereits für die Auswertung der ersten fertigen Schnitte genutzt werden.

BIRC5 zeigte sich sowohl in der Analyse im Zellmodell als auch in der mRNA gewonnen aus Patientengewebe als ein möglich tumorspezifischer Kandidat, wies also in den jeweiligen Tumorproben eine höhere Expression als in den Normenkontrollen auf. Leider konnte mit dem verwendeten BIRC5-Antikörper sowohl mit den Ventana Benchmark Systemen als auch mit händischen Färbemethoden keine technisch zufriedenstellende Färbung erzielt werden. Weitere Untersuchungen zur Etablierung wären hier nötig gewesen. Zudem wären eine weitere Analyse

für zukünftige Fragestellungen u. U. vielversprechen, da zur prognostischen Bedeutung von BIRC5 bereits Daten vorliegen: u.a. beschrieb Senol *et al* bereits 2015 eine Assoziation zwischen einer BIRC5 Überexpression und einer schlechten Prognose bei aggressiver Erkrankung (Senol *et al.* 2015).

Wie bereits im Material-und-Methoden-Teil beschrieben, wurden für die 17 Marker, je nach der bestimmten Fragestellung, verschiedene Auswertungssysteme ausgewählt. Für Marker wie Ki67, EGFR oder PD-L1 liegen bereits weit angenommene Auswertungsmethoden und Indices vor. Für die in dieser Arbeit identifizierten Marker, die auf Ihre Tumor Spezifität getestet werden sollten und auch die lymphatischen Marker, war dies allerdings nicht der Fall. Für die Inflammationsmarker sowie Immuncheckpoint-Proteine wurde anhand der klinischen Routine des Instituts der Pathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf vorgegangen, die Methode ist aktuell jedoch von keiner Publikation gestützt.

Für die experimentellen Marker wurden Auswertungsmethoden aus unterschiedlichen Publikationen gewählt, diese befassten sich allerding in großen Anteilen mit anderen Entitäten und nicht mit dem Urothelkarzinom. Die Auswertungsmethode für EGFR und TROP2 beruhten auf Studien basierend auf einer an Mammakarzinomen erkrankten Kohorte (Hwangbo *et al.* 2013; Bardia *et al.* 2021). Bei NECTIN4 lagen u. a. Proben aus Brust-, Bronchial-, Prostata- und Pankreas-Karzinomen vor, allerdings wurde auch Urothelkarzinom-Gewebe in die Studie eingeschlossen (Challita-Eid *et al.* 2016). Zudem wurde diese Methode inzwischen ebenfalls in Studien eingesetzt, die sich ausschließlich mit dem metastasierten Urothelkarzinom auseinandersetzen (Klümper *et al.* 2024). Die Auswertungsmethode für TERT wurde aus einer Studie entnommen, die sich mit der Expression dieses Markers im Glioblastom befasst (Potharaju *et al.* 2019). Es ist also möglich, dass die gewählten Auswertungsmethoden nicht ideal für die Analyse der Expression im Urothelkarzinom sind, abgesehen vielleicht von der bereits weiter erprobten Methodik für NECTIN4. Studien die sich genau damit befassten lagen zum Zeitpunkt der Auswertung aber leider auch nicht für jeden Marker vor. Auswertungsmethoden zu wählen, die bereits in anderen Studien erprobt wurden, wenn auch nicht an Urothelkarzinom-Gewebe, schien also die beste Lösung darzustellen.

Bei der angelehnt an Bardia *et al* durchgeführten Auswertungsmethode für den Marker TROP2, welche im Material und Methoden Teil in Abschnitt 2.4 genauer erläutert wird, ist anzumerken, dass eine vollständig negative Expression von TROP2 nicht erfasst wird. Ein ermittelter *H-Score* zwischen 0-100 wird von Bardia *et al* als „*low expression*“ gewertet. Da diese Information jedoch essenziell für die Beantwortung unserer Frage nach der Tumorselektivität des Markers war, wurde, wie schon im Material und Methoden-Teil erwähnt, eine vierte Kategorie hinzugefügt, die eine vollständig negative Expression aufzeichnet. Dennoch ist an dieser Auswertungsmethode zu

kritisieren, dass selbst sehr geringe Expressionslevel, wie z. B. ein H-Score von 1, genauso als positive Expression gewertet werden wie ein H-Score von 100. Dies sollte in der Einordnung der Ergebnisse mitberücksichtigt werden.

Die PD-L1 Auswertung erfolgte anhand der aktuell praxisrelevanten *Scoring*-Systeme: dem IC und CPS. Bestimmt werden diese vor dem *first-line* Einsatz von Pembrolizumab oder Atezolizumab bei Cisplatin-ungeeigneten Patienten (Eckstein *et al.* 2019). Ein weitere Auswertungsmethode ist die Bestimmung des TPS (*tumor proportion score*). Da dieser aber beim Urothelkarzinom nur eine Rolle für die Indikationsstellung bei einer Subgruppe von Patienten in der periooperativen Therapie spielt (Bajorin *et al.* 2021), wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Bestimmung dieses Scores verzichtet. Obwohl sich die Bestimmung dieser *Scores* für den Einsatz der Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren in der klinischen Routine bereits gut etabliert hat, gibt es noch Unklarheiten über einige Punkte in der genauen Durchführung. Diese beginnt bereits bei der Auswahl des zu untersuchenden Gewebes, am häufigsten wird hier aus TUR-B gewonnenes Material ausgewählt. Entscheidend ist hier, dass invasive Tumorareale mit ausreichend Tumorzellen und möglichst wenigen Artefakten bedingt durch die Kauterisation verwendet werden. Auf die Invasivität und das geringe Vorliegen von Artefakten konnte in dieser Publikation ausreichend geachtet werden. Durch die Arealgröße der in dieser Publikation verwendeten *cores*, anstelle von vollständigen Gewebeschnitten, war ein höheres Risiko gegeben, dass nicht genügend Tumorzellen erfasst sind. Die zu untersuchende Arealgröße ist allerdings auch noch nicht standardisiert, i.d.R. werden aber volle Gewebeschnitten eingesetzt. Eine weitere Einschränkung der eher kleinen Arealgröße ist die verminderte Abbildung der intratumoralen Heterogenität. Die Bestimmung der *Scores* in jeweils zwei *cores* pro Eingriff und zusätzlich noch in den folgenden Zystektomien sowie Metastasen-Biopsien konnte dies hoffentlich ausgleichen. Ein weiteres Problem bei der Auswahl des zu untersuchenden Gewebe ist der nachweisliche Effekt einer neoadjuvanten Chemo- oder auch Immuntherapie auf die PD-L1 Expression (Necchi *et al.* 2018). Dies ist ein weiterer Punkt, der für die Bestimmung der PD-L1 Expression in den TUR-B vor Einsatz einer Immun-*checkpoint*-Inhibitor *first-line* Therapie spricht. Da zahlreiche *cores* in den von uns erstellten TMAs neoadjuvant oder immuntherapiertes Gewebe enthalten, ist ein Verfälschung bzw. Verzerrung der hier ermittelten PD-L1-Expressionen wahrscheinlich. In den Auswertungen der Ergebnisse sollte dies berücksichtigt werden.

Ursprünglich war in dieser Dissertation vorgesehen, zusätzlich zu dem gesunden Lymphknoten-Gewebe in den TMAs auch ein so genanntes „*matched tissue*“ als Normalkontrolle zu verwenden. Dieses stammte aus dem Blasengewebe zweier Patienten der Kohorte, und zwar aus den anzunehmend gesunden Teilen, die nicht mit dem Tumor befallen waren. In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich jedoch ein nahezu identisches Färbeverhalten des hier abgebildeten Urothels zu den reinen Tumor-Cores. Anzunehmen ist, dass dieses u. a. durch

chronische Entzündungen bereits verändert war. Hierauf wird im Abschnitt 4.2.3 weiter eingegangen. Ein Vergleich mit „gesundem“ Blasengewebe konnte somit in dieser Publikation nicht gegeben werden. Dies stellt eine Limitierung dieser Arbeit dar. Ideal wäre ein Vergleich mit vollständig gesundem Blasengewebe von nicht-erkrankten Individuen. Da in diesen Fällen aber keine rechtfertigende Indikation für eine Entnahme der Blase vorliegt, ist dieses sehr rar. Eine Methode, die eine Lösung für diese Problematik darstellen könnte, sind sogenannte „*rapid autopsy*“ Programme. „*Rapid autopsies*“, oder auch „warme Autopsien“, sehen eine Entnahme von Patientengewebe unmittelbar nach dem Tod vor. Ein entscheidender Schritt dieser Programme ist das vorherige Einholen des Einverständnisses der Patienten sowie die Erstellung nötiger Infrastrukturen, um den Zeitverlust möglichst gering zu halten. Je nach Fragestellung kann durch das so gewonnene Normal- oder auch z. B. metastasierte Tumorgewebe eine große Bandbreite an Forschungsprojekten unterstützt werden. Insbesondere Fragen zur Pathobiologie und dem Verlauf verschiedener maligner Erkrankungen könnten von der Etablierung dieses Vorgehens profitieren. In den USA existieren bereits ca. 20 verschiedene „*rapid autopsy programs*“ (Bacon *et al.* 2020), in Deutschland gestaltet sich ein Aufbau dieser Programme auf Grund ethischer sowie rechtlicher Bedenken allerdings schwierig. Im Rahmen der Corona-Pandemie wurde eine erste Organisation gegründet, die eine zügige Obduktion ermöglicht und arrangiert, das „Deutsche Netzwerk für Obduktionen bei Pandemien (DEFEAT PANDEMICS)“ (Stillfried und Boor 2021). Die so zahlreich gewonnenen Erkenntnisse zur Pathogenese sowie Komplikationen der COVID-19-Erkrankung zeigten die große Signifikanz des durch die Obduktionen erreichten Informationsgewinn. Es lässt sich erhoffen, dass sich diese Praxis in Zukunft auch in Deutschland auf die Tumorforschung ausbreiten wird.

Außerdem ist anzumerken, dass in dieser Arbeit die Auswertung der Proben durch die Doktorandin unter Supervision einer erfahrenen Pathologin durchgeführt worden sind. Eine doppelt verblindete Auswertung durch mehrere Pathologen, wie sie insbesondere in Zulassungsstudien gefordert wird, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt. Darüber hinaus war der klinische Verlauf der jeweils eingeschlossenen Patient*innen der Doktorandin bekannt. Insofern kann eine *observer bias* im Rahmen der Befundung nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden (Hrobjartsson *et al.* 2012).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. In vitro Validierung der Kandidaten an Zelllinien

Nach Durchführen der *in silico* Analysen zur Identifikation neuer Zielmoleküle für Antitumortherapien wurden die so ermittelten Kandidaten mittels quantitativer real time RT-PCR

in Tumor- und gesunden Kontrollzelllinien weiter validiert. Die Analyse der Genexpression wurde hier in insgesamt 23 Zelllinien durchgeführt wobei es sich bei sieben dieser Kulturen um Normalzelllinien, bei 15 um Urothelkarzinomzelllinien gehandelt hat. Gesucht waren Kandidaten, die eine durchschnittlich höhere Expression in den Tumor- als den Kontrollzelllinien aufwiesen. Dies war der Fall für *ADAM22*, *FAM129A*, *TERT* und *ALPP*.

Die geringste Expression in den Normalkontrollen wies *TERT* auf. In Primärkulturen aus Uroepithelzellen war gar keine *TERT*-Expression detektierbar. Lediglich in zwei weiteren Normalkontrollen ließ sich überhaupt eine *TERT*-Expression nachweisen, und zwar in *TERT-NHUC* und *HBLAK*. Im Falle von *TERT-NHUC* handelt es sich auch um eine Primärkultur aus Uroepithelzellen, die jedoch künstlich durch *TERT*-Überexpression immortalisiert wurde (Chapman *et al.* 2006). Eine schwache *TERT*-Expression war auch in der *HBLAK*-Zelllinien nachweisbar. Diese kommerzielle Zelllinie stammt ebenfalls aus einer Primärkultur von normalen Uroepithelzellen ab, die jedoch spontan immortalisiert ist. Bei der Charakterisierung der Zelllinie konnte die Arbeitsgruppe eine Mutation im *TERT*-Promotor feststellen, die teilweise auch in Tumoren gefunden werden kann (Hoffmann *et al.* 2016). Berücksichtigt man dies, erscheint *TERT* als höchst-tumorspezifischer Marker in unserem Experiment. Dies würde mit den Erkenntnissen in der aktuellen Literatur und den bisherigen Kenntnissen über die Funktion von *TERT* übereinstimmen (u.a. Hayashi *et al.* 2021; Isharwal *et al.* 2019, genaueres im folgenden Abschnitt).

TERT, diese Abkürzung steht für „Telomerase Reverse-Transkriptase“, ist ein katalytischer Subkomplex des Enzyms Telomerase. Ein weiterer Bestandteil dieses Enzyms ist *TERC*, die „Telomerase-RNA-Komponente“. Einsatzort dieses Enzyms sind die Telomere, die Endstücke der Chromosomen, bestehend aus einer sich wiederholenden, doppelsträngigen „TTAGGG“ Sequenz. Bei jeder Zellteilung werden die Telomere um wenige Basenpaare verkürzt, diese verlorenen Basenpaare können von der DNA-Polymerase nicht neu synthetisiert werden. Dies führt ab einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen, der so genannten Hayflick-Grenze, durch Erreichen der codierenden Sequenzen zur Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose. Dieser Prozess wird auch als „Zellarterung“ bezeichnet. Ein Ausweg der Zelle, sich vor dieser „Alterung“ zu schützen, ist die Telomerase. Physiologisch ist die Aktivität dieses Enzyms u.a. in Stammzellen, in anderen Zellarten wird es deaktiviert. *TERT* kann als Teil des Enzyms neue TTAGGG Sequenzen synthetisieren, die Verkürzung der Telomere verhindern und so eine „replikative Unsterblichkeit“ der Zelle erschaffen (Hayashi *et al.* 2021). Tumorzellen nutzen dies aus, machen sich durch eine erneute Aktivierung der *TERT*-Aktivität „unsterblich“. 85-90% der Entitäten weisen eine hohe Telomerase Aktivität auf (Maciejowski und Lange 2017). Diese „replikative Unsterblichkeit“ wird auch zu den „*Hallmarks of Cancer*“, charakteristischen Eigenschaften, die sich Krebszellen in ihrer Entwicklung aneignen, gezählt (Hanahan und

Weinberg 2000). Abgesehen von Stammzellen sollte man somit von einer Inaktivität *TERTs* in gesunden Zellen ausgehen können, was *TERT* zu einem vielversprechenden *Target* in der Antitumortherapie machen würde.

Auch im Falle der Urothelkarzinome konnte vermehrt eine Hochregulierung von *TERT* beschrieben werden, über 90% der Patienten wiesen eine erhöhte Aktivität auf (Hayashi *et al.* 2021). Der größte Anteil der identifizierten Mutation fokussierte sich auf zwei Promotorregionen *TERTs*: C250T und C228T (Isharwal *et al.* 2019; Kurtis *et al.* 2016). Während die therapeutische Konsequenz dieser Häufung noch weitestgehend unerforscht ist, gab es bereits vermehrt Bestreben, dies als diagnostisches Tool oder prognostischen Biomarker einzusetzen zu können. So untersuchten zum Beispiel Hayashi *et al.* die Möglichkeit einer „*liquid biopsy*“, also einer Gewinnung und Analyse von Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin, als Alternative zu regelmäßigen, invasiven Zystoskopien in der Diagnostik und Nachsorge. Auch die hohen Kosten dieser, der technische Aufwand und Schmerzen für den Patienten könnten so eingespart werden. Hierfür wurden zunächst über eine *Droplet Digital PCR* bei Urinproben von Urothelkarzinompatienten die *TERT*-Promoter Mutationen in Kombination mit FGFR3-Mutationen untersucht. Hier konnte eine Sensitivität des Mutationsnachweises von 50-70% nachgewiesen werden, was mit den ermittelten Häufigkeiten der Promoter Mutationen im Urothelkarzinom Gewebe übereinstimmte. Auch in andern Publikationen konnte eine hohe Übereinstimmung von 73-90% zwischen den im Tumorgewebe und in Urinproben der Patienten nachgewiesenen Mutationen beschrieben werden (Ou *et al.* 2020). Weitere Studien zeigten Sensitivitäten zwischen 52 % und 82% sowie Spezifitäten zwischen 83% bis 99% (Zvereva *et al.* 2020). Die „*liquid biopsy*“ des Urins zeigte sich hier somit als ausreichende Methode um dem Mutationsstatus der *TERT*-Promoter zu ermitteln. Den diagnostischen Wert dieser Testmethode unterstützt weiter eine Publikation von Hosen *et al.*, in welcher dargestellt wurde, dass insbesondere die *TERT*-C288T-Promoter Mutation bereits 10 Jahre vor Entstehung eines Urothelkarzinoms in der liquid biopsy nachgewiesen werden konnte (Hosen *et al.* 2020). Auch ein Früherkennungstest im Sinne eines Screenings oder eine Erhebung als Verlaufsmarker könnte somit ein Einsatzgebiet sein. Kinde *et al* kam zu ähnlichen Ergebnissen: in dieser Publikation konnte dargestellt werden, dass bei den insgesamt acht von 11 Patienten, bei denen *TERT*-Promotor-Mutationen im Tumor und Urin nachgewiesen werden konnten, sieben ein Rezidiv erlitten. Von den sechs Mutations-negativen Patienten hingegen erlitt keiner ein Rezidiv (Kinde *et al.* 2013). Hayashi *et al* konnte ebenso zeigen, dass ein Nachweis der C228T-Promotor Mutation in „*cell free DNA*“ (cfDNA) bei Urothelkarzinom-Patienten in einem nicht-invasiven Stadium mit einer erhöhten Rezidivrate nach TUR-B assoziiert war. Größere prospektive Kohortenstudien sollten jedoch erfolgen, um das Potenzial dieser Untersuchungen im klinischen Alltag weiter zu validieren.

Ein prognostischer Wert von TERT konnte u. a. in einer Studie von Isharwal *et al* erwiesen werden. In dieser Studie wurden 398 Patienten mit Urothelkarzinomen einbezogen und die Assoziation von TERT-Veränderungen, der generellen Mutationslast und deren prognostischem Wert analysiert. Tumore mit *TERT*-Veränderungen hatten eine signifikant schlechtere Prognose, Tumore mit einer hohen Mutationslast eine bessere (Isharwal *et al.* 2019). In einer Publikation von Kouchkovsky *et al* wurden diesbezüglich speziell 119 Urothelkarzinom Patienten, die mit einer Immuncheckpoint-Therapie behandelt wurden, untersucht. Hier zeigte sich das Vorliegen einer Promotor-Mutation von TERT als Vorhersagevariabel für ein besser Progress-freies und generell besseres Überleben (Kouchkovsky *et al.* 2021).

Die hohe Tumorspezifität sowie der beschriebene diagnostische und prognostische Wert von TERT lassen annehmen, dass es sich auch um ein ideales *Target* für Antitumortherapien handeln könnte. Die in dieser Publikation gewonnenen Daten bestätigen dies weiter an einer kleinen, unabhängigen Kohorte. Wie oben erwähnt gibt es hier dennoch kaum konkrete Ansätze. Die in dieser Arbeit postulierte Anfertigung TERT-spezifischer CAR-T-Zellen könnte ein Anfang sein. Die Möglichkeit einer immunhistochemischen Bestimmung der TERT-Expression als Alternative zu den oben erwähnten Biopsie- und Analysemethoden kann außerdem untersucht werden.

Neben TERT zeigte wie oben erwähnt auch ADAM22 eine Tumorspezifität. In 11 der insgesamt 14 untersuchten Urothelkarzinom-Zelllinien lag die Expression weit oberhalb der mittleren Expression in den Normalkontrollen. In diesen lag die Expression im Durchschnitt weit unterhalb der der Tumorzelllinien, abgesehen von einem Ausreißer, der Expression in der Fibroblasten-Zelllinie. Bei *ADAM22* handelt es sich um ein Gen aus der ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*)-Familie, die allesamt membranverankerte Rezeptoren codieren. Funktionell sind sie an zahlreichen Prozessen der Zelladhäsion und Zell-Interaktion beteiligt. *ADAM22* besitzt im Gegensatz zu anderen ADAM-Genen keine Metalloprotease-Aktivität und weist eine besonders hohe Expression im Gehirn auf (The Human Protein Atlas - ADAM22). Bolger *et al* konnten ADAM22 bereits als prognostischen Marker in der Therapie des Hormontherapie-resistenten Mammakarzinoms identifizieren. Die Expression des Proteins scheint auch eine Rolle in der Resistenzentwicklung zu spielen und war signifikant mit einem schlechteren krankheitsfreiem Überleben assoziiert (Bolger und Young 2013). Auch McCartan *et al* konnten eine Assoziation zwischen einer erhöhten ADAM22-Expression und vorliegender Hormontherapie-Resistenzen sowie einem assoziierten schlechteren Gesamtüberleben nachweisen (McCartan *et al.* 2012). Auch in einer weiteren Entität, dem Gliom, konnte eine Assoziation zwischen hier erniedrigter ADAM22-Expression und einer signifikant schlechteren Prognose der Patienten gezeigt werden (Kwon *et al.* 2017). Grundsätzlich scheint also ein prognostisches Potenzial von ADAM22 zu bestehen. In Bezug auf das Urothelkarzinom der Blase ist eine Biomarker-Funktion in der Literatur allerdings nicht vorbeschrieben. In den TCGA-Daten

ist ADAM22 bei 4% der Urothelkarzinom Patienten mutiert, zudem wiesen diese Patienten ein numerisch besseres Gesamtüberleben auf, eine statistische Signifikanz konnte allerdings nicht bewiesen werden (cBioPortal - ADAM22). Die robuste Expression in den Tumorzelllinien ließ sich in der im nächsten Schritt analysierten mRNA aus Patientengewebe auch nicht weiter nachvollziehen.

Im Falle von *FAM129A* zeigte etwas weniger als die Hälfte der Tumor-Zelllinien eine Expression oberhalb dem Mittel in den Normalkontrollen. Die mittlere Expression in den Normalkontrollen wurde allerdings durch die deutlich hohe Expression in einer der Normalkontrollen-Zelllinie, und zwar TERT-NHUC, angehoben. *FAM129A* ist über die Phosphorylierung verschiedener Proteine an der Translationsregulation beteiligt und scheint ebenso Teil der Steuerung der p-53 medierten Apoptose zu sein (The Human Protein Atlas - *FAM129A*). Diverse Tumorarten weisen eine erhöhte *FAM129A* Expression auf, ein ungünstiger prognostischer Vorhersagewert wurde vom *The Human Protein Atlas* bereits beschrieben. Auch Zhu *et al* konnte einen Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von *FAM129* mRNA und einem schlechteren Gesamtüberleben darstellen (Zhu *et al.* 2018). Von klinischer Relevanz ist dies aktuell jedoch nicht, zudem war das Urothelkarzinom keiner der oben genannten Tumoren. Die Tumorspezifität setzte sich auch bei diesem Gen in unserem nächsten experimentellen Schritt, der Analyse der mRNA aus Patientengewebe, nicht fort.

Auch *ALPP* zeigte sich tumorspezifisch und wies keine Expression in den Normalkontrollen bei hoher Expression in wenigen Tumorzelllinien auf. Das von *ALPP* codierte Proteine ist eine Metalloenzym und gehört zu einer Genfamilie bestehend aus vier Isoenzymen der Alkalischen Phosphatase (The Human Protein Atlas - *ALPP*). Eine immunhistochemische Färbung von *ALPP* wird z. B. in der Diagnostik der Keimzelltumoren des Hodens eingesetzt. In diesen wird das Protein i. d. R. in großem Umfang exprimiert und kann insbesondere bei Patienten mit angenommener Metastasierung Auskunft über den Primarius geben. Reiswich *et al* untersuchten außerdem in einer 2021 veröffentlichten Studie mittels immunhistochemischen Färbungen an TMAs mit insgesamt 16166 Proben von 131 unterschiedlichen Tumortypen die Expression *ALPPs* in vielen weiteren Entitäten. Insgesamt 27% der Tumore wiesen eine mittlere bis starke *ALPP*-Expression auf. Nur 4% der invasiven Urothelkarzinome exprimierten jedoch *ALPP* (Reiswich *et al.* 2021), was mit unserem Ergebnis im Einklang zu stehen scheint. Auch wenn die Prozentzahl in dieser Publikation in den PCR der Tumorzelllinien höher lag, scheint *ALPP* nicht grundsätzlich im Urothelkarzinom exprimiert zu sein. Wenn eine Expression vorliegt, ist diese aber allem Anschein nach mäßig bis hoch. Als Therapietarget oder spezifischer Biomarker für das Urothelkarzinom ist *ALPP* somit aber kein guter Kandidat.

4.2.2. In vitro Validierung der Kandidaten an mRNA aus Patientengewebe

Neben den anhand der *in vitro* Analysen von Zelllinien ermittelten Kandidaten *ADAM22*, *FAMI29A*, *ALPP* und *TERT* wurden im nächsten Schritt, der Validierung an mRNA aus Patientengewebe, auch *BCL2*, *BIRC5*, *NECTIN4* und *TROP2* einbezogen. Als Methode wurde erneut die quantitative real-time PCR gewählt. *BCL2* und *BIRC5* zeigten sich in einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe als Kandidaten mit einem vielversprechenden Expressionsmuster in Urothelkarzinomzelllinien, während *NECTIN4* und *TROP2* bereits etablierte Targets für den Einsatz von Antikörper-Toxin-Konjugaten sind (*antibody-drug-conjugates*, ADCs). Antikörper-Toxin-Konjugate, die sich gegen die beiden Gene richten, sind zur Behandlung unterschiedlicher Tumorentitäten in Deutschland und den USA bereits zugelassen und/oder befinden sich in klinischer Testung. Relevant für das Urothelkarzinom sind Sacituzumab-Govitecan (gegen *TROP2* gerichtet, (TROPHY-U-01 Studie 2024)) und Enfortumab-Vedotin (gegen *NECTIN4* gerichtet (EV-301 Studie 2024; EV-302 Studie 2024)).

In der mRNA aus Patientengewebe zeigten *TERT*, *NECTIN4*, *TROP2* und *BIRC5* das gewünschte Expressionsmuster von einer höheren Expression in der mRNA aus Tumorgewebe als in dieser aus Normalgewebe und sollten in einem letzten Schritt über immunhistochemische Färbungen an TMAs validiert werden. Insbesondere *TERT* zeigte sich erneut als sehr tumorspezifisch, wies so gut wie keine oder nur eine sehr niedrige Expression in der mRNA aus gesundem Blasengewebe auf. *TERT* wird in Abschnitt 4.2.1 und 4.2.3, *TROP2* und *NECTIN4* in Abschnitt 4.2.3 genauer diskutiert. Wie bereits oben beschrieben, wurde bei zwar vorliegendem gewünschten Expressionsmuster, allerdings technisch nicht zufriedenstellender Färbungen an den TMAs auf eine weitere Diskussion von *BIRC5* verzichtet (siehe Abschnitt 4.1.3.).

BCL2 hingegen wies ein gegensätzliches Expressionsmuster auf, hier lag die durchschnittliche Expression im Normalgewebe deutlich über der der Tumorproben. Es bestände somit die Möglichkeit, dass sich *BCL2* als Marker für gesundes Blasengewebe eignen könnte. Vorbeschrieben ist dieses Expressionsmuster für *BLC2* allerdings nicht. Im Gegenteil, die meisten Publikation beschreiben eher eine Assoziation zwischen einer erhöhten *BCL2*-Expression und Urothelkarzinomen. So zum Beispiel eine Publikation von Korkolopoulou *et al* in welcher über Immunhistochemische Färbungen die Expression von verschiedenen Molekülen der *BCL*-Familie, inklusive *BCL2*, an Paraffin-eingebettetem Gewebe von 103 Patienten mit invasivem Blasenkrebs analysiert wurde. Hier zeigten 44,4% der Patienten eine positive Färbung für *BCL2*, unabhängig vom Stadium der Erkrankung (Korkolopoulou *et al.* 2002). In einer weiteren Immunhistochemie-basierten Publikation von Pourebrahimi *et al* wiesen allerdings nur 10% des Patientensatzes eine positive Färbung auf, insbesondere in den Tumoren in einem *low-grade*

Stadium (Pourebrahimi *et al.* 2022). Auch eine Assoziation zwischen einer hochregulierten BCL2 Expression in Blasentumoren und einer bestehenden Cisplatin-Resistenz wurde beschrieben. Kim *et al* wiesen über quantitative real time PCR 18 Gene nach, die in der Cisplatin sensitiven Zelllinie T24 niedriger exprimiert waren als in der Cisplatin resistenten Zelllinie T24R2, unter anderem auch BCL2 (Kim *et al.* 2016). Über eine Western-Blot Analyse konnte dies auf Protein-Ebene bestätigt werden und eine Relevanz von BCL2 in der Resistenzentwicklung annehmen lassen. BCL2 zeigt sich somit insgesamt eher als ein Marker für malignes Gewebe, der allerdings bei vorliegender ausgeprägter intratumoraler Heterogenität nicht ausreichend stabil in Urothelkarzinomen exprimiert zu seien scheint. Je nach Patientenkohorte kann dies also zu divergierenden Ergebnissen führen. Das entgegengesetzte Expressionsmuster unserer Kohorte lässt sich schwer erklären. Aktuell gibt es kaum Kenntnisse zu den Verhältnissen der BCL2 Expression in gesundem und tumorösem Blasengewebe. In den beiden oben erwähnten Publikationen von Korkolopoulou *et al* sowie Pourebrahimi *et al* wurde leider auch keine immunhistochemische Färbung von gesundem Blasengewebe durchgeführt, was einen weiteren Vergleich hätte ermöglichen können. Die Negativkontrollen beschränkten sich auf den Ersatz des verwendeten BCL2-Antikörpers mit Nicht-immunogenem Maus- oder Antikörperserum bzw. es wurde vollständig auf diese verzichtet. Es lässt sich somit schlussendlich nicht sicher sagen, ob BCL2 in unseren gesunden Proben tatsächlich hochreguliert ist oder in den Tumor-Proben nur eine geringe Expression aufwies. Auch der inter-methodische Vergleich macht es schwierig, eindeutige Aussagen zu formulieren. Eine weitere Beobachtung könnte somit für zukünftige Studien interessant sein.

4.2.3 Validierung von Kandidaten mittels immunhistochemischer Färbung eines TMAs

In einem letzten Schritt sollten die *in vitro* ermittelten Kandidaten *TERT*, *NECTIN4* und *TROP2* nun anhand immunhistochemischer Färbungen an manuell erstellten TMAs auf ihre Tumorspezifität untersucht werden. Das Gewebe der 60 am UKD behandelten Patienten wurde hier mit lymphatischem Gewebe als Normalkontrolle verglichen. Wie bereits in der Diskussion der Methodik erwähnt, konnte aus technischen Gründen keine zufriedenstellende immunhistochemische Färbung für *BIRC5* erzielt werden, im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf die weiter Untersuchung dieses Kandidaten verzichtet.

Da die Identifizierung neuer, vorzugsweise membranständiger, *Targets* für eine CAR-T-Zell Therapie oder andere immuntherapeutische Ansätze wie Antikörper-Konjugate eines der Ziele dieser Arbeit war, wurde hier, wenn nicht anders beschrieben, die membranäre Färbung

ausgewertet. Bei *TERT* traten allerdings einige Schwierigkeiten auf. Für dieses Protein wurden verstärkt cytoplasmatische und nukleäre Färbesignal detektiert, die eine solitäre Beurteilung der membranären Ausprägung unmöglich machten. Dementsprechend wurde hier, wie in den Ergebnissen beschrieben, eine alternative Auswertungsmethode gewählt. Zu erwähnen ist hier, dass die intrazelluläre Lokalisation von *TERT* noch nicht vollständig erforscht ist. In dieser Arbeit wurde mit Informationen aus den Datenbanken Genecards und The Human Protein Atlas gearbeitet, um die *in silico* ermittelten Kandidatengene auf solche zu beschränken, die an der Plasmamembran exprimiert sind. GeneCards bewertet die Sicherheit der Expression in den Zellkompartimenten dabei auf einer Skala von 1-5. Für *TERT* erhielten das Zytosol, der Nukleus und die Mitochondrien einen Score von 5, die Plasmamembran einen Score von 4 (Database 2023). Von The Human Protein Atlas wird die Lokalisation *TERTs* auf der Plasmamembran als „*predicted location*“ angegeben, das Zytosol und Nukleoplasma als sichere Lokalisationen (Subcellular - *TERT* - The Human Protein Atlas 2023). Aufgrund dieser Angaben wurde *TERT* als möglicher Kandidat in diese Arbeit aufgenommen. GeneCards selbst basiert diese Aussagen u. a. auf den UniProtKB- und COMPARTMENTS-Datenbanken für subzelluläre Lokalisierung sowie aus dem „Gene Ontology Consortium“. Die COMPARTMENTS-Datenbank leitet diese aus automatisierter Textanalytik biomedizinischer Literatur, Datenbankannotationen sowie sequenzbasierten Vorhersagen ab. Auch hier wurde wie oben erwähnt für jede Kategorie ein Score zwischen 1-5 vergeben, je nachdem, wie wahrscheinlich die Lokalisation in diesem Kompartiment scheint. In der COMPARTMENT-Datenbank selbst erhält *TERT* hier für die Plasmamembran einen Score zwischen minimal 1 und maximal 3, also durchschnittlich von 2 Punkten (COMPARTMENTS - *TERT* 2023). In der UniProt-Datenbank erhält die Plasmamembran als mögliche Lokalisation in den UniProt-Annotationen keine Erwähnung, in den Gene Ontology-Annotationen allerdings schon (*TERT* | UniProtKB | UniProt 2023). Es stellt sich somit die Frage, wie The Human Protein Atlas den Score von 4/5 Punkten zusammensetzt. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Publikation, die die Lokalisation von *TERT* auf der Plasmamembran beweisen kann. Mehrere Studien hingegen beschreiben *TERTs* Lokalisation im Nukleus und dem Cytoplasma. So analysierten u. a. Nguyen und Wong Interaktionen zwischen *TERT* und diversen weiteren Proteinen in den jeweiligen Kompartimenten: Nach Synthese des *TERT* Proteins im Zytosol wird es in den Zellkern transportiert, in H1299-Bronchialkarzinomzellen wirkten daran diverse Proteine wie HSP90, p23 und FKBP52 mit (Nguyen und Wong 2020). Eine Interaktion oder Funktion auf der Plasmamembran wurde hier nicht beschrieben. Eindeutig lässt sich dies dennoch nicht ausschließen. Eine weitere Analyse der Lokalisation des *TERT*-Proteins über vergleichende Färbungen an unterschiedlichen Geweben oder den Einsatz von verschiedenen Antikörpern könnte neue Informationen bezüglich der *TERT*-Lokalisation in dem Zellkompartiment Plasmamembran schaffen. Auch eine erneute

Analyse der immunhistochemisch gefärbten Präparate, entweder von einem geübteren Pathologen oder unter Anwendung eines anderen Färbeprotokolls, könnte hier neue Erkenntnisse bereitstellen.

Eine weitere Schwierigkeit in der Beurteilung von einer Eignung TERTs als CAR-T-Zell-Therapie-*Target* in dieser Arbeit war die 100%ige Expression von TERT in unseren Normalkontrollen, dem Lymphknotengewebe.

Neben der 100%igen Expression in den Lymphknoten zeigte *TERT* zytoplasmatisch eine Positivität von 74%, nuklear sogar von 99%. Eine Aktivität der Telomerase und somit auch von ihrem Subkomplex *TERT* in Lymphozyten wurde in diversen Studien bereits beschrieben, die durchgehende Nachweisbarkeit in unseren Normalkontrollen lässt sich also leicht erklären. In den meisten somatischen Zelltypen liegt keine endogene Telomerase-Aktivität vor, in T-Zellen hingegen wird diese durch Aktivierung der Zelle bei Interaktion des T-Zell-Rezeptors und den erforderlichen Costimulatorischen Signalen hochreguliert (Roth *et al.* 2003; Liu *et al.* 1999). In diesem Fall scheint dies allerdings nicht mit einer Immortalität der Zelle einherzugehen, ganz im Gegensatz zu einer Telomerase-Reaktivierung in den meisten Tumorzellen, durch welche eine „replikative Unsterblichkeit“ erreicht wird. Roth *et al* untersuchten den Einfluss dieser Hoch-Regulierung auf die Lebensdauer der T-Zellen genauer, indem sie die Konsequenzen einer Hemmung dieser endogenen Aktivität durch forcierte Expression verschiedener Doppel-Negativer Varianten des *hTERT*-Gens analysierten: Die so transduzierten T-Zellen wiesen eine kürzere Lebensspanne sowie vermehrt zellgenetische Abweichungen auf. Die Aktivität *TERTs* in den T-Zellen verursacht also keine Immortalität, scheint aber eine entscheidende Rolle in der Regulation der Lebensspanne zu spielen (Roth *et al.* 2003). Liu *et al* konnten außerdem nachweisen, dass eine detektierbare Menge *hTERTs* in sämtlichen humanen Lymphozyten unabhängig vom eigentlichen Aktivitätslevel der Telomerase exprimiert wurde, dieses scheint also nicht mit der *hTERT* Transkriptionsmenge zu korrelieren (Liu *et al.* 1999).

Eine Nichteignung von lymphatischem Gewebe als Negativkontrolle für die Expression *TERTs* war somit absehbar. Der dazu kommende gescheiterte Vergleich mit der Expression in dem „*matched tissue*“ bedeutete, dass für *TERT* keine validen Normalkontrollen in den TMAs vorlagen. Eine wirkliche Selektivität konnte somit methodisch nicht bewiesen werden. Auf diese Problematik wurde bereits in dem Abschnitt 4.1.3 eingegangen. Kombiniert mit der oben diskutierten Problematik bezüglich der unklaren Lokalisation von TERT an der Plasmamembran scheint dieser Marker nach aktuellem Kenntnisstand zwar nicht ideal für eine systemische CAR-T-Zell-Therapie, eine lokal angewandte Applikation, z. B. intravesikal, könnte bei der gegebenen Tumorspezifität aber durchaus vielversprechend sein und in Zukunft getestet werden.

Neben TERT wurden auch Färbungen für NECTIN4 und TROP2 durchgeführt. Diese Gene sind beide *Targets* von Antikörper-Toxin Konjugaten. Enfortumab Vedotin, gerichtet gegen

NECTIN4, ist seit 2022 auch in Deutschland für die Behandlung des Urothelkarzinoms zugelassen, entweder als *second line* Therapie oder bei Cisplatin-ungeeigneten Patienten. In der EV-302 Studie zeigten sich zudem vielversprechende Daten bezüglich einer Kombination und Anwendung von Enfortumab Vedotin und Pembrolizumab bei Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Blasenkrebs, diese war der platinbasierten Chemotherapie deutlich überlegen. Einer der Endpunkte war das Progress-freie Überleben. In der Gruppe, die eine platinbasierte Chemotherapie erhielt, lag dieses bei 6,3 Monaten, in der Gruppe die Enfortumab Vedotin und Pembrolizumab erhielten war dieses mit 12,5 Monaten nahezu doppelt so hoch (EV-302 Studie 2024). Dies führte bereits Ende 2023 zu einer Erstlinien-Zulassung der Kombination in Amerika (US Food & Drug Administration 2023), im September 2024 folgte eine Zulassung in Europa. Sacituzumab govitecan, gerichtet gegen TROP2, ist seit 2021 in den USA zugelassen. Beide Marker zeigten sich gänzlich negativ in den Lymphknoten-Normalkontrollen. In den Tumorproben wies NECTIN4 eine durchschnittliche Positivität von 95%, TROP2 von 93%, auf. Unabhängig von der Gewebelokalisation/ dem Eingriffstyp (Primärtumor in den TURBs und Zystektomien oder Metastase) und des Behandlungszeitpunkts (Primärdiagnose oder fortgeschrittenes Stadium) waren nahezu alle Tumorproben NECTIN4-positiv, wohingegen der Anteil an positiv gefärbten Proben bei TROP2 vom Primärtumor zu den Metastasen zunahm (ca. 55% vs. 90% positive Proben) und somit deutlichere Differenzen in Bezug auf die Gewebslokalisierung und den Eingriffstypen vorlagen. Ebenfalls auffällig war hier, dass mehr TUR-B-Proben mit einer zwar positiven, aber als niedrig eingestuften Expression vorlagen. In den Zystektomien und Metastasen-Biopsien zeigten sich mehr Proben moderat bis stark positiv. Bei gegebener Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse bestünde somit eine Relevanz zum besten Einsatzzeitpunkt der Antikörper-Therapien, bei dem mit der größten *response* gerechnet werden könnte. So wäre anzunehmen, dass ein Einsatz von Sacituzumab govitecan, dem monoklonalen Antikörper gerichtet gegen TROP2, insbesondere im metastasierten Stadium von Nutzen wäre. In anderen veröffentlichten Studien wurde diese veränderte Expression im Zuge der Krankheitsprogression noch nicht vorbeschrieben. In einer Publikation von Ghali *et al* wurde die Proteinexpression von TROP2 und NECTIN4 anhand 67 Proben von 20 Patienten, gewonnen in einem *rapid-autopsy*-Verfahren, im Primärtumor und den entsprechenden Metastasen analysiert. Zehn Proben stammten dabei aus dem Primarius, bei den restlichen 57 Proben handelte es sich um Metastasen-Biopsien. Abgesehen von den Proben, die sich dem neuroendokrinen Subtypen zuordnen ließen, ließ sich eine hinweg moderate bis hohe Expression von NECTIN4 und TROP2 nachweisen. Insbesondere auch TROP2 zeigte hier sowohl im Primarius als auch in den Metastasen eine konstant hohe Expression und keine Zunahme im metastasierten Gewebe (Ghali *et al.* 2023), anders als in dem von uns ermittelten Expressionsmuster. Allgemein liegen zu dieser Fragestellung aber eher wenige Daten vor. In diversen aktuell laufenden Studien wird der neoadjuvante Einsatz von Sacituzumab govitecan geprüft, u. a. in einer vom IRCCS San Raffaele

gesponsert und durchgeführten Studie (NCT05226117). Konkrete Ergebnisse stehen hier noch aus, sollte die in unserer Arbeit nachgewiesene geringeren Expression im Primarius allerdings kein Einzelfall sein, wäre von einer eher niedrigen *response rate* im nicht-metastasierten-Stadium auszugehen. Eine Korrelation der Daten zum klinischen Ansprechen und der TROP2-Expression je nach klinischem Stadium könnte künftig also eine interessante Fragestellung sein. Interessanterweise konnte eine Abnahme der Expression mit zunehmender Krankheitsprogression in einer von Hoffman-Censis *et al* publizierten Studie für NECTIN4 nachgewiesen werden. 86 Patienten mit einem muskelinvasiven Blasenkrebs wurden immunhistochemisch auf ihre NECTIN4-Expression untersucht, insgesamt 15 der 22 Urothelkarzinom-Proben, und somit 68,2%, zeigten sich dabei positiv. Auffällig war, dass mit etwa 90% Positivität die Expression in den Karzinomen in nicht-invasiven Stadien am höchsten war. Im invasiven Stadium bis in die Lamina propria sank dies auf 80%, bei Invasion bis in den Muskel auf 70% (Hoffman-Censis *et al.* 2021). In der in dieser Publikation analysierten Kohorte konnte nur eine geringe Abnahme der NECTIN4-Expression im Verlauf vom Nicht-invasiven in ein Muskel-invasives Stadium beobachtet werden: in den TUR-B Proben waren ca. 98% der NECTIN4 positiv, in den Zystektomien fiel dieser Prozentsatz auf 93% ab, in den Metastasen zeigte sich allerdings erneut ein geringer Anstieg auf 94%. Die Verteilung in eine starke, moderate oder schwache Expression war in den drei Stadien weitgehend identisch. Eine genauere Analyse der Expression im Zuge der Krankheitsexpression mit einer größeren Kohorte könnte hier in Zukunft mehr Einsicht bringen. Zudem konnte in einer Studie von Klümper *et al* ein deutlicher Zusammenhang zwischen vorliegender NECTIN4-Amplifikation, einer häufigen Mutation in MIBC, und einem Ansprechen auf Enfortumab Vedotin dargestellt werden: 96% vs. 32% zeigten ein Ansprechen auf Enfortumab Vedotin in den jeweiligen Untergruppen mit/ohne vorliegende Amplifikationen (Klümper *et al.* 2024). Auch der neoadjuvante Einsatz von Enfortumab Vedotin wird aktuell in diversen Studien erprobt (EV-304 Studie 2024; VOLGA - Studie 2024), konkrete Ergebnisse stehen hier allerdings noch aus. Wenn sich die in unserer Publikation dargestellte durchweg hohe Expression von NECTIN4 auch in anderen Kohorten bestätigen lässt, könnte jedoch mit einem guten Ansprechen in der Neoadjuvanz gerechnet werden.

Zusammenfassend kann die veränderte Expression von TROP2 und NECTIN4 im Zuge der Krankheitsprogression anhand der aktuellen Forschungsergebnisse weder bewiesen noch widerlegt werden. In Einklang bringen lässt sich allerdings die auch in dieser Publikation nachgewiesene Selektivität sowie durchweg höhere Expression der beiden Marker im Urothelkarzinom. Neben den bereits durchgeführten Antikörpertherapien wäre somit unter Umständen auch eine CAR-T-Zell-Therapie gerichtet gegen diese beiden Marker explorationswürdig.

4.2.4 Molekulare Subtypen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Unterteilung der Kohorte in molekulare Subtypen durch immunhistochemische Färbungen, angelehnt an eine Publikation von Sjödahl *et al* (Sjödahl *et al.* 2019). Es existieren diverse Ansätze zur molekularen Subtypisierung des Urothelkarzinoms, gemein haben diese, dass die unterschiedlichen Subtypen mit verschiedenen Prognosen und Therapieansprechen in Verbindung gebracht werden konnten. So konnte z. B. in einer im November 2023 von Koll *et al* veröffentlichten Studie anhand von 143 Genexpressionsprofilen von Patienten mit muskelinvasivem Blasenkrebs, die sich einer radikalen Zystektomie unterzogen, ein signifikanter Überlebensvorteil von Patienten des Basalen-Subtypens bei Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie nachgewiesen werden. Patienten, die dem luminalen Subtypen angehörten, profitierten dem entgegengesetzt nicht signifikant durch den Einsatz dieser Therapie (Koll *et al.* 2023). In diesen Zusammenhängen lässt sich also, u. a. durch den möglichen prädiktiven Wert dieser Subtypen, eine weitere Möglichkeit für eine möglichst Patienten-spezifische Anti-Tumorthерапie erhoffen. Auf die verschiedenen Ansätze zur Subtypisierung wird in Abschnitt 1.8 der Einleitung weiter eingegangen.

Die molekulare Subtypisierung fand in dieser Arbeit für die TUR-B und Zystektomie-Proben getrennt statt. Bei Betrachtung der TUR-B ließen sich 50% der Patienten dem GU, 28% dem URO, 13% dem Basal-SCC-like und 7% dem Mes-like Subtypen zuordnen. Bei den Zystektomien lag eine ähnliche Verteilung vor, hier ließen sich 42% in dem GU, 32% in dem URO, 16% in dem Basal-SCC-like und 7% in dem Mes-like Subtyp einordnen. Ein NE-like Subtyp lag in unserer Kohorte nicht vor.

Diese Verteilung entspricht im Wesentlichen einer klassischen Verteilung, die sich auch in anderen Kohorten beobachten lässt. So machen der URO- und GU-Typ, somit die luminalen Subtypen, zusammengezählt den größten Anteil aus, gefolgt vom Anteil der Patienten mit dem Basalen Subtypen. An dritter Stelle stehen meist die Stroma-reichen oder mesenchymalen Subtypen, den letzten Platz belegt in der Regel der Neuronale/Neuroendokrin-ähnliche Subtyp. Dies lässt sich z. B. in einer Publikation des TCGA aus dem Jahre 2018 beobachten: am häufigsten war hier mit 42% der URO-Subtyp, darauf folgte mit 27% der Basal-SCC-like Subtyp, an dritter Stelle lag der GU-Subtyp mit 14%, an Vierter der Mes-like Subtyp mit 9% und am seltensten war der NE-like-Subtyp mit 5% (Marzouka *et al.* 2018). In unserer Kohorte ist somit im Vergleich der größere Anteil des GU-Subtyps an der Luminalen-Fraktion auffällig. Auch in einer 2019 veröffentlichten Publikation der „*The Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group*“ lag, wenn auch nicht bei ganz deckungsgleichen, aber dennoch vergleichbaren Subtypen, eine ähnliche Verteilung zu unseren Ergebnissen und denen des TCGAs vor: von insgesamt 1750 analysierten Transkriptomen machte auch hier der Luminal Subtyp, weiter unterteilt in *Luminal*

Papillary, *Luminal-Non-Specified* und *Luminal unstable* mit insgesamt 47% den größten Anteil aus. An zweiter Stelle stand mit 35% des Basale-Subtyp, an Dritter der *Stroma-rich* mit 15% und an Letzter Stelle der *Neuroendocrine-like* Subtyp mit 3% (Kamoun *et al.* 2020).

In Zukunft soll die erfolgte Einteilung in die Subtypen mit den vorliegenden klinischen Daten, insbesondere zum Therapieansprechen und Überleben der Patienten, korreliert werden. Um eindeutige Aussagen zu treffen und eine tatsächlich prädiktive klinische Anwendung der Subtypen zu ermöglichen ist die Analyse einer großen Anzahl an unabhängigen Kohorten nötig. Die weitere Untersuchung dieser UKD-hauseigenen Kohorte wird hoffentlich zu diesem großen Bestreben beitragen können.

4.2.5. Charakterisierung von Immunmarkern

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Expression der Immuncheckpoint-Proteinen PD1, PD-L1, LAG3 und TIGIT, sowie der Inflammationsmarker CD4, CD8 und FOXP3, bestimmt. Hier wurde die gängige Auswertungsmethode des Instituts der Pathologie angewendet, genauer geschildert in Abschnitt „2.4 Immunhistochemische Färbungen und Auswertung“. Die Expression wurde in den Tumor- und Stroma-Kompartimenten und für die drei Eingriffstypen, TUR-B, Zystektomie und Metastasen-Biopsie, getrennt betrachtet.

Anhand der IC- und CPS-Scores wurde festgestellt, dass die PD-L1-Expression in unserer Kohorte eher niedrig war und dabei wenige stark positive Ausreißer aufwies. Bemerkenswert ist, dass diese stark positiven Ausreißer insbesondere in den TUR-B und Zystektomien vorlagen, in dem Eingriffstyp der Metastasen ließen sich diese kaum nachweisen. Der Vergleich der Mittelwerte zwischen den drei Eingriffstypen zeigte jedoch keine Signifikanz. Das im Vergleich zu den TUR-B und Zystektomien verminderte Vorliegen von diesen hohen Expressionen bzw. Ausreißern in den Metastasen, also bei zunehmendem Stadium der Erkrankung, könnte durch den Einsatz von u. a. der Immuncheckpoint-Therapie in der Kohorte gegeben sein. Es ließ sich u. a. auch bereits nachweisen, dass sich nach Einsatz einer neoadjuvanten Chemotherapie vermehrt Diskrepanzen in der PD-L1 Expression beschreiben lassen (Jong *et al.* 2018). Der Einsatz dieser Therapie in unserer Kohorte ist somit wahrscheinlich auch einer der beeinflussenden Faktoren. Anpassungen der Tumoren im Sinne von Resistzenzen sind ebenfalls denkbar. In einer Studie von Eckstein *et al.* wurde die Diskrepanz zwischen der Expression im Primärtumor und den korrespondierenden Metastasen, in diesem Fall spezifisch Lebermetastasen, bereits genauer untersucht. Im Vergleich zu anderen Orten der Metastasierung wurde bei Patienten mit vorliegender Metastasierung in die Leber in diversen Studien eine geringere Ansprechraten auf eine Immuncheckpoint-Therapie beschrieben. Die Bestimmung der PD-L1 Expression wurde in

diesen Studien in der Regel an Gewebe des Primärtumors vorgenommen, welches u. a. durch die oben genannten Mechanismen nicht die Expression in den Metastasen widerspiegeln muss. Eckstein *et al* analysierten daraufhin das sequenziell gewonnene Primärtumor- (TUR-B), Zystektomie- und Metastasen-Gewebe von 14 Patienten und konnten nachweisen, dass die PD-L1 und PD-1-Expression im Primärtumor signifikant höher war als in den Lebermetastasen. 57% der Metastasen-Proben zeigten sogar einen kompletten Verlust der Expression (Eckstein *et al.* 2018). Auch wenn sich keine Signifikanz nachweisen ließ, die in dieser Publikation tendenziell beobachtete Abnahme der PD-L1 Expression in den Metastasen ist somit kein Einzelfall zu sein. Konsequenz dieser Beobachtung sollte sein, eine Bestimmung der PD-L1 Expression bei Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom in den Metastasen selbst anzustreben, um das Ansprechen auf die Immuncheckpoint-Therapie besser vorhersagen zu können. Eine Untersuchung der Konkordanz der PD-L1 Expression anhand einer größeren Fallzahl sollte hierzu durchgeführt werden. Die genauen Mechanismen hinter diesen Veränderungen in der Expression sind noch unklar.

In den TUR-B zeigten sich signifikant mehr Lymphozyten LAG3 positiv im Tumor- als im Stroma-Kompartiment, dies ließ sich in den anderen Eingriffstypen nicht mehr nachweisen. LAG3 bzw. „*lymphocyte activation gene-3*“ war nach PD-L1 und CTLA4 der dritte Immuncheckpoint-Rezeptor, der in der Antitumortherapie als *Target* verwendet wurde (Andrews *et al.* 2017). LAG3 ist homolog zu CD4 aufgebaut, bindet somit ebenfalls an MHCII auf z. B. Dendritischen Zellen die folgend aktiviert werden. Auf aktivierten T-Zellen fungiert LAG3 analog zu PD-1 als hemmender Rezeptor: nach der aktivierenden Bindung des T-Zell-Rezeptors assoziiert sich LAG3 an CD3 und hemmt endogen die Aktivierung, Vermehrung und Effektorfunktion von CD8- und CD4-positiven T-Zellen (The Human Protein Atlas - LAG3). LAG3 ist somit ein Marker für aktivierte CD8- und CD4-positive T-Zellen (Triebel *et al.* 1990). Regulatorische T-Zellen (T_{regs}) exprimieren LAG3 dauerhaft. Eine fortdauernde Aktivierung, z. B. in tumorösem oder chronisch inflammatorisch verändertem Gewebe, resultiert in einer anhaltenden Expression von LAG3 und weiteren inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1, was zu einer Funktionsstörung der T-Zellen im Sinne einer funktionellen Ermüdung führt. Die Rolle dieser Rezeptoren in der Erschöpfung der T-Zellen wurde in diversen Studien anhand eines Infektionsmodells mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) untersucht. Ähnlich zu Tumoren liegt auch in chronischen Infektionen eine dauerhafte Antigenexposition vor. Mittels einer Transkriptionsanalyse wurden die erschöpften T-Zellen mit einer erhöhten Expression der Immuncheckpoint-Rezeptoren identifiziert und analysiert, sämtliche dieser Zellen wiesen eine verminderte Zytokin-Sekretion und Proliferationsrate auf. Durch eine duale Blockade von LAG3 und PD1 konnte dieser Erschöpfung entgegengewirkt, die Zytokin Produktion erhöht und folgend die Viruslast gesenkt werden (Richter *et al.* 2010). In einer Studie von Woo *et al* konnte ebenfalls

eine Expression von LAG3 und PD-1 auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen im Malignen Melanom, Kolonkarzinomen und Fibrosarkomen nachgewiesen werden, passend zu der Verteilung unserer Kohorte, wenn auch in anderen Entitäten (Woo *et al.* 2012). Auch eine bevorzugte Expression von LAG3 auf tumorinfiltrierenden regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu den in der Peripherie verbleibenden T_{regs} konnte bereits nachgewiesen werden. Die Rolle dieser T-Zellen in der Erschöpfung oder weitere Funktionen dieser sind allerdings noch umstritten (Andrews *et al.* 2017). Zusammenfassend stimmt die ermittelte erhöhte Expression von LAG3 in den tumorinfiltrierenden Lymphozyten somit mit der aktuellen Literatur überein. Die erhöhte LAG3-Expression im Tumor-Kompartiment unserer TUR-B-Proben könnten also ein Zeichen für aktivierte CD8- und CD4-positive T-Zellen, aber auch für eine beginnende Erschöpfung dieser sein. Die geringe PD-1 Expression und somit die fehlende Koexpression weiterer inhibitorischer Rezeptoren in unserer Kohorte könnte jedoch eher gegen die Erschöpfung sprechen. Dennoch wäre eine duale Blockade von PD-1 und LAG3 ein interessanter, weiterer Ansatz in der Immuntherapie des Urothelkarzinoms, der das Spektrum der ansprechenden Patienten erweitern könnte. Vollendete Studien gibt es aktuell noch nicht. Im Januar 2022 wurde eine von der *Incyte Corporation* durchgeführte, randomisierte Phase 2 Studie zum neoadjuvanten Einsatz eines LAG3-Antikörpers in Kombination mit u. a. PD-1-Antikörpern bei Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom, die nicht für eine Cisplatin-basierte Therapie in Frage kommen gestartet (Huo *et al.* 2022). Inzwischen wurde diese bedauerlicherweise wohl aus monetären Gründen terminiert (Optimus - Studie 2024). Neben der therapeutischen scheint auch eine prognostische Relevanz von LAG3 zu bestehen. In einer aktuellen Studie konnte anhand der TCGA-Blasenkrebs-Kohorte eine Assoziation zwischen einem besseren Gesamtüberleben und einer geringen LAG3-Expression bzw. einem schlechteren Überleben bei erhöhter Expression dargestellt werden (Sholklapper *et al.* 2023).

Die Inflammationsmarker zeigten in unseren Ergebnissen die am ehesten zu erwartende Verteilung, passend zu den Funktionen der korrespondierenden T-Zellen. Die CD4-Expression, also u. a. die T-Helferzellen, zeigte sich höher im Stroma. Signifikant war dies allerdings nur in den TUR-B und den Zystektomien. In den TUR-B zeigten sich signifikant mehr Lymphozyten im Tumor-Kompartiment CD8-positiv und somit als Zytotoxische T-Zellen (Taniuchi 2018). Nicht signifikant war dies in den Zystektomien und Metastasen-Biopsien. Im Falle von FOXP3 konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Sowohl bei LAG3 als auch bei CD4 und CD8 ist ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Tumor- und Stroma-Kompartimenten nur in den TUR-B bzw. im Falle von CD4 in den TUR-B und Zystektomien nachzuweisen. Mit fortschreitendem Stadium der Erkrankung, also insbesondere in den Metastasen-Biopsien, nähern sich die Expressionslevel der beiden Kompartimente an und es lässt sich kein signifikanter Unterschied mehr nachweisen. Die mittlere

CD8-Expression lag in den TUR-B im Tumorkompartiment bei 54%, in den Zystektomien bei 58% und sank in den Metastasen auf 48%. Im Stroma Kompartiment stieg sie im Verlauf tendenziell an, lag zunächst bei 37%, dann bei 49% und schließlich bei 45% in den jeweiligen Eingriffstypen. Die CD4-Expression im Tumorkompartiment blieb von TUR-B bis Metastasen-Biopsie nahezu konstant und lag bei 22%, 23% und schließlich 25%. Im Stroma fiel die Expression von 43% in den TUR-B auf 39% in den Zystektomien und schließlich auf 33% in den Metastasen. Tendenziell scheint die Immunantwort im Laufe der Erkrankung also abzunehmen. Erklärbar wäre dies u. a. durch eine zunehmende Immunevasion der Tumorzellen, z. B. durch eine Hochregulierung der PD-L1 Expression. Dagegen spricht allerdings der durchschnittlich geringere CPS in den Metastasen-Biopsien. Der Einsatz einer Immuntherapie bei einigen Patienten der untersuchten Kohorte könnte diese Ergebnisse allerdings auch verzerren und in ihrer Beurteilbarkeit einschränken. Ebenfalls denkbar wäre eine zunehmende Erschöpfung der T-Zellen durch die chronische Antigenexposition in der Tumorumgebung, wie bereits oben in der Diskussion zur LAG3-Expression erwähnt. Hierfür könnte die, wenn auch durchweg eher geringe, zunehmende PD-1 Expression in den Zystektomien und Metastasen-Biopsien sprechen. Eine endgültige Aussage ist hier schwierig zu treffen. Urothelkarzinome der Blase sind für ihre Immunogenität und Bildung einer immunsuppressiven Tumor-Mikroumgebung bekannt, passend zu den in dieser Publikation ermittelten Daten. Neben der bereits erwähnten Immunevasion durch die vermehrte Expression von PD-L1 wird dies durch die Anwesenheit diverser immunsuppressiver Zellen wie Tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) und *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) oder die vermehrte Produktion anti-entzündlicher Zytokine wie PGE2 oder IL-10 bewerkstelligt (Crispen und Kusmartsev 2020). In ihrer Gemeinheit verursachen diese Mechanismen ein verminderteres klinisches Ansprechen auf die eingesetzten Immuntherapien. Ein genaues Verständnis und die gezielte Bekämpfung dieser Mechanismen hat somit ein großes Potenzial, die Immunantwort zu verstärken und ein besseres therapeutisches *outcome* zu erzielen.

4.2.6. Analyse der Proliferationsrate

Auch eine Analyse der Proliferationsrate wurde mittels einer Analyse der Ki67-Expression in der Kohorte vorgenommen. In der Interphase lässt sich dieses Protein allein im Zellkern nachweisen, während der Mitose verlagert sich der Großteil dieses Antigens auf die Oberfläche der Chromosomen. Ki67 wird während der G1-, S- und G2-Phase sowie während der Mitose exprimiert, also in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, lässt sich in ruhenden Zellen, also während der G0-Phase, allerdings nicht nachweisen. Der Anteil der Ki67-Expression gibt also einen guten Rückschluss auf den Anteil sich teilender Zellen. In den letzten Jahren hat dies

insbesondere in der Tumorforschung an Bedeutung zugewonnen, eine hohe Proliferationsrate hat oft einen Einfluss auf die Prognose und den Verlauf der Erkrankung (Scholzen und Gerdes 2000).

Burstkrebs ist hier eine der am besten erforschten Entitäten, die Ki67-Expression wird sowohl zum Grading der Erkrankung als auch zur Ermittlung der Prognose herangezogen. So korreliert eine hohe Ki67-Expression unter anderem mit einem erhöhten pTNM-Stadium (Kanyılmaz *et al.* 2019). Aber auch im Bereich der Urothelkarzinome der Blase wird der prognostische Wert der Ki67-Expression zunehmend Bestandteil der Forschung, es konnte z. B. eine Korrelation zwischen einer erhöhten Ki67-Expression und einer vermehrten Rezidivrate nachgewiesen werden (Pich *et al.* 2002). In der aktuellen S3-Leitlinie wird eine Bestimmung von molekularen Prognosemarkern außerhalb von Studien nicht empfohlen, einen Einzug in die klinische Routine hat dies also noch nicht gefunden. Lediglich in Einzelfällen soll bei bestehender Unsicherheit eine Bestimmung von Ki67 (und CK20 sowie p53) erfolgen, um eine Unterscheidung in ein *low-* oder *high-grade* nicht-muskelinvasives Urothelkarzinom zu ermöglichen. Für das muskelinvasive Urothelkarzinom gibt es hier keine Empfehlung (AWMF 2020). Dennoch gehört Ki67 zu einem der am meisten untersuchten und vielversprechendsten prädiktiven sowie prognostischen Kandidaten. Fest eingesetzt wird die immunhistochemische Bestimmung von Ki67 zur Unterstützung der Differenzierung zwischen einem tatsächlichen *Carcinoma in situ* und reaktiv verändertem Urothel (AWMF 2020).

Die Ki67-Expression wurde in dieser Publikation getrennt für die drei verschiedenen Eingriffstypen TUR-B, Zystektomien und Biopsien von Metastasen betrachtet und folgend verglichen. Ein signifikanter Unterschied konnte hier zwischen den TUR-B und den Zystektomien nachgewiesen werden: die Ki67-Expression, und somit die Proliferationsrate, war in den TUR-B signifikant höher. Dies könnte sich durch die bei einem Teil der Kohorte vor der Durchführung der Zystektomien zum Einsatz gekommene neoadjuvante Chemotherapie erklären lassen.

In den Metastasen-Biopsien zeigte sich die größte Streuung der Werte, höchstwahrscheinlich zu erklären durch das unterschiedliche Ansprechen auf die eingesetzten Therapien. Eine genaue Korrelation mit den klinischen Verlaufsdaten könnte hier in Zukunft von Interesse sein.

4.2.7. Untersuchung prädiktiver Biomarker für die neoadjuvante Chemotherapie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, prädiktive Biomarker zu untersuchen und zu identifizieren, die das Ansprechen auf etablierte Therapien bei Patienten vorhersagen können. Zunächst haben

wir die Gruppe der in der urologischen Onkologie des UKD neoadjuvant behandelten Patienten diesbezüglich untersucht und nach dem klinischen Ansprechen in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 zeigte das beste Ansprechen im Sinne einer vollständigen Remission, Gruppe 3 das schlechteste Ansprechen im Sinne eines Progresses. Gruppe 2 zeigte ein moderates Ansprechen mit bestehender Resterkrankung. Zwischen diesen drei Gruppen wurde nun die prä-therapeutische Expression von TERT, NECTIN4, TROP2 und Ki67 verglichen.

Die Ki67-Expression, und somit die Proliferationsrate, zeigte einen stetigen Rückgang mit zunehmend schlechterem Ansprechen der Patienten. Die Gruppe mit dem besten Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie, also Gruppe 1, hatte vor der Behandlung die höchste durchschnittliche Proliferationsrate, gefolgt von der Gruppe mit einem mäßigen Ansprechen und schließlich der Gruppe mit einem schlechten Ansprechen. Dieser Trend war eindeutig erkennbar, lediglich zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ließ sich jedoch ein signifikanter Unterschied nachweisen. Je höher die vor der Behandlung gemessene Proliferationsrate in unserer Kohorte, desto besser war also das Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie. Diese Ergebnisse erscheinen logisch, wenn man bedenkt, dass die Chemotherapie auf sich schnell teilende Zellen abzielt. Die eingesetzten Substanzen sind in der Regel Cisplatin-basiert, einem Alkylans, das durch Vernetzung von DNA-Strängen zu einem Zellzyklus-Arrest und dem folgenden Zelltod führt. Daher könnte Ki67 ein guter prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie sein und die klinische Routine durch einfache immunhistochemische Färbung unterstützen. Ein häufiges Problem im klinischen Alltag ist die Entscheidung zwischen dem Einsatz einer adjuvanten oder neoadjuvanten Chemotherapie. 40-60% der Patienten zeigen ein Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie, 20-40% erreichen eine vollständige Remission (Anari *et al.* 2018; Peyton *et al.* 2018; Iyer *et al.* 2020). Bei den Patienten die nicht auf die Therapien ansprechen kann der Tumor in der Zeit bis zur Zystektomie allerdings auch weiter wachsen und sich die Prognose somit deutlich verschlechtern (Zargar *et al.* 2015). Eine vorherige immunhistochemische Bestimmung der Ki67-Expression wäre eine zeiteffiziente und kostengünstige Methode den Kliniker in dieser Entscheidung zu unterstützen. Um einen eindeutigen *cut-off*-Wert festlegen zu können sollten in Zukunft weitere Studien mit größeren und diversen Kohorten erfolgen.

In der aktuellen Forschung wird der prognostische Wert von Ki67 in Bezug auf das Urothelkarzinom der Blase bereits rege diskutiert. In verschiedenen Studien wurde bereits eine Assoziation zwischen einer gesteigerten, immunhistochemisch bestimmten, Ki67-Expression und u. a. einer erhöhten Mortalität oder größeren Rezidiv-Wahrscheinlichkeit nachgewiesen. So konnten z. B. Culpan *et al* eine Signifikanz des Zusammenhangs in beiden dieser Fälle nachweisen. Die Patienten mit Ki67-positiven-Tumoren wiesen ein schlechteres Gesamt-, Progressions- und Rezidiv-freies Überleben auf (Culpan *et al.* 2021). Diese Studie beschränkte

sich allerdings auf Tumoren im pT1 Stadium. Auch Shariat *et al* beschränkten sich zunächst auf die Analyse von Patienten dieses Stadiums, die zusätzlich mit radikaler Zystektomie behandelt wurden. Auch hier war eine Ki67-Positivität sowohl mit einer erhöhten Rekurrenz-Wahrscheinlichkeit als auch einer erhöhten krankheitsspezifischen Mortalität assoziiert (Shariat *et al.* 2009). El-Gendi *et al* untersuchten einen ähnlichen Zusammenhang, konnten allerdings keine Signifikanz in Bezug auf eine erhöhte Rezidiv-Wahrscheinlichkeit nachweisen, empfiehlt demgegenüber aber größere Studien mit standardisierten Kriterien hinsichtlich *cut-off* Werten oder Patientencharakteristika (El-Gendi und Abu-Sheasha 2018). Weitere Studien zeigten u.a. auch eine positive Assoziation zwischen einem erhöhten Proliferationsindex und einem erhöhten Tumorstadium sowie -grad (Elkady *et al.* 2018; Yamuç *et al.* 2022). Ein prognostischer Wert von Ki67 scheint also zweifelslos zu bestehen. Auch in Bezug auf andere Entitäten wurde eine prognostische Funktion von Ki67 beschrieben. Das Mammakarzinom ist hier einer der am besten erforschten Tumore. Aber auch hier ist keine umfassende Standardisierung zur Bestimmung und Interpretation verfügbar. Lediglich auf der Basis eines Expertenkonsenses konnte festgelegt werden, dass ab einer positiven Ki67-Expression von 25% oder mehr des Tumors man von einem erhöhten Risiko ausgehen kann. Zeigen sich 10% oder weniger positiv ist das Risiko eines negativen Krankheitsverlaufes eher gering (AWMF 2021). Das eindeutige Festlegen von *cut-off* Werten gestaltet sich also selbst in größeren und vielzähligen Studien als schwierig, unter anderem auch durch die sehr heterogenen Studienaufbauten. Ähnlich verhält sich dies auch bei anderen Entitäten: in Bezug auf das nicht-kleinzelige-Lungenkarzinom konnten zahlreiche Studien eine Assoziation zwischen einer erhöhten Ki67-Expression nach Resektion und einer ungünstigeren Prognose, einem schlechteren krankheitsfreiem und rezidivfreiem Überleben nachweisen (Chirieac 2016). Eingeschränkt werden diese Erkenntnisse in ihrer Aussagekraft u. a. durch die Verwendung unterschiedlicher Ki67-Klone, andere Auswertungsmethoden der Immunhistochemie und begrenzte Größen der Kohorten. All dies führt dazu, dass sich Ki67 auch in der Diagnostik und Therapie des Lungenkarzinoms noch nicht als routinemäßig eingesetzter Marker etablieren konnte. Auch für eine andere häufige Entität, das Prostatakarzinom, konnte ein prognostischer Wert von Ki67 nachgewiesen werden (Zellweger *et al.* 2009), auch hier war eine erhöhte Expression mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert. Einzug in die klinische Routine hat die immunhistochemische Bestimmung allerdings auch hier noch nicht gefunden.

Zusammengefasst zeigt sich in vielen Entitäten eine Verbindung zwischen einer erhöhten Proliferationsrate, also einer erhöhten Ki67-Expression, und einer schlechteren Prognose oder auch einer höheren Rezidivrate. So auch im Urothelkarzinom, passend zu den in dieser Publikation ermittelten Daten. Eine Standardisierung oder die Formulierung eines Konsenses ist durch die stark heterogenen Studienaufbauten und eher kleinen Kohorten nur eingeschränkt

möglich. Diese Einschränkung könnten nur große, randomisierte Studien mit einer diversen Kohorte von an Urothelkarzinomen erkrankten Patienten beheben.

Neben diesen zahlreichen Daten zum prognostischen Wert von Ki67 liegen auch bereits wenige Studien vor, die sich mit therapeutisch prädiktiven Möglichkeiten auseinandersetzen. Koga *et al* untersuchten verschiedene Biomarker, darunter auch Ki67, und deren prädiktiven Aussagewert im Hinblick auf das Ansprechen auf eine Radiochemotherapie-basierte Erhaltungstherapie bei nicht metastasiertem, muskelinvasivem Blasenkrebs. Eingesetzt wird diese aktuell u. a. bei einer Nichteignung der Patienten für eine radikale Zystektomie. Allerdings haben nur die Patienten, die nach der Radiochemotherapie ein vollständiges Ansprechen erreichen eine erfolgsversprechende bzw. verbesserte Prognose. Biomarker, die die klinischen Ergebnisse vorhersagen könnten, wären somit von großem Nutzen. Ki67 stellte sich hier als einer dieser möglichen Marker da, eine erhöhte Expression war mit diesem vollständigen Ansprechen assoziiert und könnte somit als Entscheidungshilfe zwischen der radikalen Zystektomie oder der Radiochemotherapie dienen (Koga *et al.* 2018). Long *et al* untersuchten den gleichen Sachverhalt in Bezug auf intravesikale Instillationen zur Rezidiv-Reduktion des sekundären Blasenkrebs bei Patienten mit Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts, welche sich einer radikalen Nephrektomie unterzogen haben. Auch hier sollten die Patienten identifiziert werden, die von der Therapie signifikant profitieren und so eine möglichst individualisierte Therapie etabliert werden. Patienten mit einer niedrigen Ki67-Expression schienen hier empfindlicher auf die Installationen anzusprechen als diese mit sehr hohem Proliferationsindex (Long *et al.* 2016).

Ein prädiktives Potenzial des Proliferationsindex scheint somit zweifelslos zu bestehen und könnte ein nächster Ansatz in der personalisierten Therapie von Blasenkrebs und dem Einsatz der neoadjuvanten Chemotherapie sein. Dennoch sollten diese Ergebnisse in größeren Kohorten bestätigt werden.

NECTIN4, TROP2, zytoplasmatisches und nukleäres TERT zeigten keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen den anhand des klinischen Ansprechens unterteilten Gruppen 1-3, lassen sich anhand der Daten dieser Publikation also nicht als prädiktive Marker annehmen. Im Falle von der nukleären TERT-Expression war zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar, es ließ sich aber ein Trend für ein schlechteres Ansprechen mit zunehmender nuklearer TERT-Expression darstellen. Die Gruppe 3 wies also eine durchschnittlich höhere Expression auf als Gruppe 1, wenn auch nicht signifikant. Die Funktion von TERT als Mechanismus der Tumorzelle um sich zu immortalisieren, wurde bereits im Abschnitt 4.2.3 diskutiert. Basierend darauf erscheint ein schlechteres Ansprechen bei erhöhter Expression initial als logisch. In diversen Studien konnten prognostische Ansätze der TERT-Expression dargestellt werden (Isharwal *et al.* 2019), in Bezug auf die prädiktive Wertigkeit bei

der neoadjuvanten Chemotherapie existieren diese jedoch noch nicht. Größere prospektive Kohortenstudien wären eine Möglichkeit, um das prädiktive Potenzial TERTs weiter zu validieren.

4.3 Schlussfolgerung und Zusammenfassung

Bezüglich der Identifizierung möglicher neuer Therapietargets zeigten sich TERT, NECTIN4 und TROP2 als hoch exprimierte Gene im Tumorgewebe. NECTIN4 und TROP2 zeigten sich zusätzlich tumorspezifisch, wiesen also keine Expression in unseren Normalkontrollen auf, sind allerdings auch schon als eben solche Marker bekannt. Bei TERT entfiel aufgrund diverser methodischer Schwierigkeiten ein Vergleich mit validen Normkontrollen, trotz der durchweg hohen Tumorexpression konnte eine Selektivität somit nicht bewiesen werden. Zusätzlich dazu ergab sich die Schwierigkeit der Beurteilung der membränaren Expression von TERT, gegeben durch die Überstrahlung durch die deutlicheren zytoplasmatischen sowie nukleären Färbungen. Dies stellt eine Limitierung dieser Studie dar. Dennoch erscheint der mögliche Einsatz von TERT als *Target* für Antikörper- oder CAR-T-Zell-Therapien als ein interessanter Forschungsansatz, der in zukünftigen Projekten genauer exploriert werden kann. Zusätzlich auffällig in unseren Ergebnissen war, dass bei TROP2 zum einen der Anteil an positiv gefärbten Proben und zum anderen die Intensität dieser (niedrig bzw. stark positiv) vom Primärtumor zu den Metastasen zunahm. Bei gegebener Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse bestünde somit eine Relevanz zum besten Einsatzzeitpunkt der Antikörper-Therapien, um ein möglichst hohes Ansprechen zu erzielen. In der Literatur ist dies nicht vorbeschrieben, eine weitere Analyse dieses Expressionsverlaufs kann in Zukunft vorgenommen werden.

In der Untersuchung prädiktiver Biomarker für die neoadjuvante-Chemotherapie zeigte sich insbesondere Ki67 als vielversprechend. Hier bestand ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen der Gruppe mit dem vollständigen und der Gruppe mit dem fehlenden Ansprechen: In der Gruppe der Patienten, die nach neoadjuvanter Chemotherapie eine vollständige *Response* erreichten, war die Ki67-Expression signifikant höher. Wenn man bedenkt, dass Chemotherapeutika sich-teilende-Zellen angreifen und Ki67 einen Proliferationsindex darstellt, erscheint dieser Zusammenhang als logisch. Gegeben durch die eher kleine Kohorte ist dies in seiner Aussagekraft allerdings limitiert. Es sollte angestrebt werden, dies anhand größerer Kohorten weiter zu validieren. Wenn es in Zukunft möglich wäre, anhand einer prätherapeutischen, immunhistochemischen Bestimmung der Ki67-Expression das Ansprechen anhand eines *cut-off*-Wertes vorherzusagen, könnte dies die klinische Routine in der Entscheidung zwischen einer adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie unterstützen. Auch TERT zeigte ein interessantes Expressionsmuster, je höher die TERT-Expression, desto schlechter war

das Ansprechen. Signifikant war dieser Unterschied allerdings nicht, auch wenn sich dieser Trend deutlich erkennen ließ. Eine erneute Analyse dieser Fragestellung anhand einer größeren Kohorte bietet sich hier an.

Die in dieser Studie durchgeführte molekulare Charakterisierung der gegebenen Kohorte bietet außerdem Basis für diverse weitere Fragestellungen: die nach Sjödahl *et al* ermittelten Subtypen sollten mit den vorliegenden klinischen Daten bezüglich Therapieansprechen und Überleben korreliert werden. Die in der Bestimmung von Immunmarkern festgestellte Abnahme der PD-L1 Expression in den Metastasen, welche laut aktueller Literatur kein Einzelfall zu sein scheint, wirft Gedanken zum bestmöglichen Zeitpunkt der immunhistochemischen Expressionsbestimmung zur Vorhersage des Ansprechens auf die Immun-*Checkpoint*-Therapie auf. Eine weitere Untersuchung dieses Expressionsverlaufs könnte in Zukunft interessant sein. Die signifikant höhere Expression von LAG3 in den tumorinfiltrierenden Lymphozyten lässt ein möglich besseres Ansprechen bestimmter Patienten durch eine duale Blockade von PD-1 und LAG3 erhoffen.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Aine, Mattias; Eriksson, Pontus; Liedberg, Fredrik; Sjödahl, Gottfrid; Höglund, Mattias (2015): Biological determinants of bladder cancer gene expression subtypes. In: *Scientific reports* 5, S. 10957. DOI: 10.1038/srep10957.
- Amsberg, Gunhild von; Retz, Margitta; Santis, Maria de; Niegisch, Günter (2022): Erstlinientherapie des metastasierten Urothelkarzinoms: ein Update. In: *Onkologie* 28 (9), S. 792–798. DOI: 10.1007/s00761-022-01217-5.
- Anari, Fern; O'Neill, John; Choi, Woonyoung; Chen, David Y.T.; Haseebuddin, Mohammed; Kutikov, Alexander *et al.* (2018): Neoadjuvant Dose-dense Gemcitabine and Cisplatin in Muscle-invasive Bladder Cancer: Results of a Phase 2 Trial. In: *European urology oncology* 1 (1), S. 54–60. DOI: 10.1016/j.euo.2018.02.007.
- Andersen, Claus Lindbjerg; Jensen, Jens Ledet; Ørntoft, Torben Falck (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. In: *Cancer research* 64 (15), S. 5245–5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Andrews, Lawrence P.; Marciscano, Ariel E.; Drake, Charles G.; Vignali, Dario A. A. (2017): LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. In: *Immunological reviews* 276 (1), S. 80–96. DOI: 10.1111/imr.12519.
- Antoni, Sébastien; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Znaor, Ariana; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2017): Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. In: *European urology* 71 (1), S. 96–108. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.06.010.
- Apolo, Andrea B.; Ballman, Karla V.; Sonpavde, Guru P.; Berg, Stephanie A.; Kim, William Y.; Parikh, Rahul Atul *et al.* (2024): AMBASSADOR Alliance A031501: Phase III randomized adjuvant study of pembrolizumab in muscle-invasive and locally advanced urothelial carcinoma (MIUC) vs observation. In: *JCO* 42 (4_suppl), LBA531-LBA531. DOI: 10.1200/JCO.2024.42.4_suppl.LBA531.
- AWMF (2020): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. Version 2.0. Hg. v. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Stiftung Deutsche Krebshilfe (DKH). Online verfügbar unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/Version_2.0/LL_Harnblasenkarzinom_Langversion_2.0.pdf.

AWMF (Hg.) (2021): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (AWMF-Registernummer: 032-045OL). Online verfügbar unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Kurzversion_4.3.pdf, zuletzt geprüft am 03.09.2023.

Bacon, Eliza R.; Ihle, Kena; Lee, Peter P.; Waisman, James R. (2020): Building a rapid autopsy program – a step-by-step logistics guide. In: *transl med commun* 5 (1). DOI: 10.1186/s41231-020-00074-x.

Bajorin, Dean F.; Witjes, J. Alfred; Gschwend, Jürgen E.; Schenker, Michael; Valderrama, Begoña P.; Tomita, Yoshihiko *et al.* (2021): Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 384 (22), S. 2102–2114. DOI: 10.1056/NEJMoa2034442.

Bardia, A.; Tolaney, S. M.; Punie, K.; Loirat, D.; Oliveira, M.; Kalinsky, K. *et al.* (2021): Biomarker analyses in the phase III ASCENT study of sacituzumab govitecan versus chemotherapy in patients with metastatic triple-negative breast cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 32 (9), S. 1148–1156. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.06.002.

Barker, Chris (2009): The Mean, Median, and Confidence Intervals of the Kaplan-Meier Survival Estimate—Computations and Applications. In: *The American Statistician* 63 (1), S. 78–80. DOI: 10.1198/tast.2009.0015.

Battifora, H. (1986): The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 55 (2), S. 244–248.

Bendle, Gavin M.; Linnemann, Carsten; Hooijkaas, Anna I.; Bies, Laura; Witte, Moniek A. de; Jorritsma, Annelies *et al.* (2010): Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. In: *Nature medicine* 16 (5), 565-70, 1p following 570. DOI: 10.1038/nm.2128.

Berry, A.; Iriart, X.; Filliaux, J.; Magnaval, J-F (2017): Schistosomose urogénitale et cancer. In: *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)* 110 (1), S. 68–75. DOI: 10.1007/s13149-017-0547-4.

Bolger, Jarlath C.; Young, Leonie S. (2013): ADAM22 as a prognostic and therapeutic drug target in the treatment of endocrine-resistant breast cancer. In: *Vitamins and hormones* 93, S. 307–321. DOI: 10.1016/B978-0-12-416673-8.00014-9.

- Brancato, Sam J.; Lewi, Keidren; Agarwal, Piyush K. (2015): Evolving immunotherapy strategies in urothelial cancer. In: *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, e284-90. DOI: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.e284.
- Bubeník, J.; Baresová, M.; Viklický, V.; Jakoubková, J.; Sainerová, H.; Donner, J. (1973): Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. In: *International journal of cancer* 11 (3), S. 765–773. DOI: 10.1002/ijc.2910110327.
- Camp, R. L.; Charette, L. A.; Rimm, D. L. (2000): Validation of *tissue microarray* technology in breast carcinoma. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80 (12), S. 1943–1949. DOI: 10.1038/labinvest.3780204.
- cBioPortal - ADAM22. Online verfügbar unter https://www.cbioportal.org/results/comparison?cancer_study_list=blca_msk_tcga_2020&tab_index=tab_visualize&case_set_id=blca_msk_tcga_2020_all&Action=Submit&gene_list=ADAM22&comparison_subtab=survival, zuletzt geprüft am 31.10.2024.
- Challita-Eid, Pia M.; Satpayev, Daulet; Yang, Peng; An, Zili; Morrison, Karen; Shostak, Yuriy et al. (2016): Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. In: *Cancer research* 76 (10), S. 3003–3013. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1313.
- Chapman, E. J.; Hurst, C. D.; Pitt, E.; Chambers, P.; Aveyard, J. S.; Knowles, M. A. (2006): Expression of hTERT immortalises normal human urothelial cells without inactivation of the p16/Rb pathway. In: *Oncogene* 25 (36), S. 5037–5045. DOI: 10.1038/sj.onc.1209513.
- Chirieac, Lucian R. (2016): Ki-67 expression in pulmonary tumors. In: *Translational Lung Cancer Research* 5 (5), S. 547–551. DOI: 10.21037/tlcr.2016.10.13.
- Choi, Woonyoung; Porten, Sima; Kim, Seungchan; Willis, Daniel; Plimack, Elizabeth R.; Hoffman-Censits, Jean et al. (2014): Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. In: *Cancer cell* 25 (2), S. 152–165. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.009.
- Colley, Daniel G.; Bustinduy, Amaya L.; Secor, W. Evan; King, Charles H. (2014): Human schistosomiasis. In: *Lancet (London, England)* 383 (9936), S. 2253–2264. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2.
- COMPARTMENTS - TERT (2023). Online verfügbar unter https://compartments.jensenlab.org/Entity?figures=subcell_cell_%&knowledge=10&textmining=10&experiments=10&predictions=10&type1=9606&type2=-22&id1=ENSP00000309572, zuletzt aktualisiert am 02.07.2023, zuletzt geprüft am 02.07.2023.

Compérat, Eva; Wasinger, Gabriel; Oszwald, André; Shariat, Shahrokh F. (2022): Brief update of the new WHO classification for urothelial carcinoma. In: *Current opinion in urology* 32 (5), S. 511–516. DOI: 10.1097/MOU.0000000000001020.

Compérat, Eva M.; Burger, Maximilian; Gontero, Paolo; Mostafid, A. Hugh; Palou, Joan; Rouprêt, Morgan *et al.* (2019): Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". In: *European urology focus* 5 (3), S. 457–466. DOI: 10.1016/j.euf.2018.01.003.

Crispen, Paul L.; Kusmartsev, Sergei (2020): Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 69 (1), S. 3–14. DOI: 10.1007/s00262-019-02443-4.

Culpan, Meftun; Turan, Turgay; Ozkanli, Sidika Seyma; Zenginkinet, Tulay; Kazan, Ozgur; Ucar, Taha *et al.* (2021): Prognostic and clinicopathologic value of ki-67 and profilin 1 immunohistochemical expression in primary pT1 urothelial bladder cancer. In: *Journal of cancer research and therapeutics* 17 (2), S. 434–442. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_408_19.

Damrauer, Jeffrey S.; Hoadley, Katherine A.; Chism, David D.; Fan, Cheng; Tiganelli, Christopher J.; Wobker, Sara E. *et al.* (2014): Intrinsic subtypes of *high-grade* bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (8), S. 3110–3115. DOI: 10.1073/pnas.1318376111.

Database, GeneCards Human Gene (2023): TERT Gene - GeneCards. Online verfügbar unter <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TERT#localization>, zuletzt aktualisiert am 02.07.2023, zuletzt geprüft am 02.07.2023.

Duong, Connie P. M.; Yong, Carmen S. M.; Kershaw, Michael H.; Slaney, Clare Y.; Darcy, Phillip K. (2015): Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic. In: *Molecular immunology* 67 (2 Pt A), S. 46–57. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.12.009.

Eckstein, Markus; Cimadomore, Alessia; Hartmann, Arndt; Lopez-Beltran, Antonio; Cheng, Liang; Scarpelli, Marina *et al.* (2019): PD-L1 assessment in urothelial carcinoma: a practical approach. In: *Annals of translational medicine* 7 (22), S. 690. DOI: 10.21037/atm.2019.10.24.

Eckstein, Markus; Sikic, Danijel; Strissel, Pamela L.; Erlmeier, Franziska (2018): Evolution of PD-1 and PD-L1 Gene and Protein Expression in Primary Tumors and Corresponding Liver Metastases of Metastatic Bladder Cancer. In: *European urology* 74 (4), S. 527–529. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.06.028.

El-Gendi, Saba; Abu-Sheasha, Ghada (2018): Ki-67 and Cell Cycle Regulators p53, p63 and cyclinD1 as Prognostic Markers for Recurrence/ Progression of Bladder Urothelial Carcinoma. In: *Pathology oncology research : POR* 24 (2), S. 309–322. DOI: 10.1007/s12253-017-0250-2.

Elkady, Noha; Sultan, Mohamed; Elkhouly, Enas (2018): Evaluation of topoisomerase II, ki-67, and P53 expression in non-muscle-invasive urothelial carcinoma and their clinical significance. In: *Indian journal of pathology & microbiology* 61 (4), S. 526–531. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM_588_17.

Elliott, A. Y.; Bronson, D. L.; Cervenka, J.; Stein, N.; Fraley, E. E. (1977): Properties of cell lines established from transitional cell cancers of the human urinary tract. In: *Cancer research* 37 (5), S. 1279–1289.

Elliott, A. Y.; Cleveland, P.; Cervenka, J.; Castro, A. E.; Stein, N.; Hakala, T. R.; Fraley, E. E. (1974): Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract. In: *Journal of the National Cancer Institute* 53 (5), S. 1341–1349. DOI: 10.1093/jnci/53.5.1341.

Epstein, J. I.; Amin, M. B.; Reuter, V. R.; Mostofi, F. K. (1998): The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. In: *The American journal of surgical pathology* 22 (12), S. 1435–1448. DOI: 10.1097/00000478-199812000-00001.

Eskaros, Adel Rh; Egloff, Shanna A. Arnold; Boyd, Kelli L.; Richardson, Joyce E.; Hyndman, M. Eric; Zijlstra, Andries (2017): Larger core size has superior technical and analytical accuracy in bladder tissue microarray. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 97 (3), S. 335–342. DOI: 10.1038/labinvest.2016.151.

EV-301 Studie. A Study to Evaluate Enfortumab Vedotin Versus (vs) Chemotherapy in Subjects With Previously Treated Locally Advanced or Metastatic Urothelial Cancer (EV-301) (2024) (NCT03474107). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03474107>, zuletzt aktualisiert am 16.10.2024, zuletzt geprüft am 31.10.2024.

EV-302 Studie. Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab vs. Chemotherapy Alone in Untreated Locally Advanced or Metastatic Urothelial Cancer (EV-302) (2024) (NCT04223856). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04223856?term=EV302&rank=1>, zuletzt aktualisiert am 27.09.2024, zuletzt geprüft am 31.10.2024.

EV-304 Studie. Perioperative Enfortumab Vedotin (EV) Plus Pembrolizumab (MK-3475) Versus Neoadjuvant Chemotherapy for Cisplatin-eligible Muscle Invasive Bladder Cancer (MIBC) (MK-3475-B15/ KEYNOTE-B15 / EV-304) (KEYNOTE-B15) (2024) (NCT04700124). Online verfügbar unter

<https://clinicaltrials.gov/study/NCT04700124?term=EV304&rank=1>, zuletzt aktualisiert am 26.01.2024, zuletzt geprüft am 31.10.2024.

Farling, Kristen Burns (2017): Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management. In: *The Nurse practitioner* 42 (3), S. 26–33. DOI: 10.1097/01.NPR.0000512251.61454.5c.

Fogh, J.; Fogh, J. M.; Orfeo, T. (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. In: *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1), S. 221–226. DOI: 10.1093/jnci/59.1.221.

Ghali, Fady; Vakar-Lopez, Funda; Roudier, Martine P.; Garcia, Jose; Arora, Sonali; Cheng, Heather H. *et al.* (2023): Metastatic Bladder Cancer Expression and Subcellular Localization of Nectin-4 and Trop-2 in Variant Histology: A Rapid Autopsy Study. In: *Clinical genitourinary cancer*. DOI: 10.1016/j.clgc.2023.05.014.

Goebell, Peter J.; Knowles, Margaret A. (2010): Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. In: *Urologic oncology* 28 (4), S. 409–428. DOI: 10.1016/j.urolonc.2010.04.003.

Green, David A.; Rink, Michael; Xylinas, Evangelos; Matin, Surena F.; Stenzl, Arnulf; Roupret, Morgan *et al.* (2013): Urothelial carcinoma of the bladder and the upper tract: disparate twins. In: *The Journal of urology* 189 (4), S. 1214–1221. DOI: 10.1016/j.juro.2012.05.079.

Grossman, H. B.; Wedemeyer, G.; Ren, L.; Wilson, G. N.; Cox, B. (1986): Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. In: *The Journal of urology* 136 (4), S. 953–959. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)45139-1.

Grunewald, Camilla M.; Haist, Corinna; König, Carolin; Petzsch, Patrick; Bister, Arthur; Nößner, Elfriede *et al.* (2021): Epigenetic Priming of Bladder Cancer Cells With Decitabine Increases Cytotoxicity of Human EGFR and CD44v6 CAR Engineered T-Cells. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 782448. DOI: 10.3389/fimmu.2021.782448.

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2000): The Hallmarks of Cancer. In: *Cell* 100 (1), S. 57–70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Harshitha, Ravikumar; Arunraj, Duraipandian Rex (2021): Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. In: *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 49 (5), S. 800–812. DOI: 10.1002/bmb.21552.

Hayashi, Yujiro; Fujita, Kazutoshi; Netto, George J.; Nonomura, Norio (2021): Clinical Application of TERT Promoter Mutations in Urothelial Carcinoma. In: *Frontiers in oncology* 11, S. 705440. DOI: 10.3389/fonc.2021.705440.

Hepp, Zsolt; Shah, Sonali N.; Smoyer, Karen; Vadagam, Pratyusha (2021): Epidemiology and treatment patterns for locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: a systematic literature review and gap analysis. In: *Journal of managed care & specialty pharmacy* 27 (2), S. 240–255. DOI: 10.18553/jmcp.2020.20285.

Hoffman-Censits, Jean H.; Lombardo, Kara A.; Parimi, Vamsi; Kamanda, Sonia; Choi, Woonyoung; Hahn, Noah M. et al. (2021): Expression of Nectin-4 in Bladder Urothelial Carcinoma, in Morphologic Variants, and Nonurothelial Histotypes. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 29 (8), S. 619–625. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000938.

Hoffmann, Michèle J.; Koutsogiannouli, Evangelia; Skowron, Margaretha A.; Pinkerneil, Maria; Niegisch, Günter; Brandt, Artur et al. (2016): The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors. In: *Bladder cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2 (4), S. 449–463. DOI: 10.3233/BLC-160065.

Hoos, A.; Cordon-Cardo, C. (2001): *Tissue microarray* profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81 (10), S. 1331–1338. DOI: 10.1038/labinvest.3780347.

Hosen, Md Ismail; Sheikh, Mahdi; Zvereva, Maria; Scelo, Ghislaine; Forey, Nathalie; Durand, Geoffroy et al. (2020): Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study. In: *EBioMedicine* 53, S. 102643. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102643.

Hrobjartsson, A.; Thomsen, A. S. S.; Emanuelsson, F.; Tendal, B.; Hilden, J.; Boutron, I. et al. (2012): Observer bias in randomised clinical trials with binary outcomes: systematic review of trials with both blinded and non-blinded outcome assessors. In: *BMJ* 344 (feb27 2), e1119-e1119. DOI: 10.1136/bmj.e1119.

Hume, Samuel; Dianov, Grigory L.; Ramadan, Kristijan (2020): A unified model for the G1/S cell cycle transition. In: *Nucleic Acids Research* 48 (22), S. 12483–12501. DOI: 10.1093/nar/gkaa1002.

Huo, Jin-Ling; Wang, Ya-Tao; Fu, Wen-Jia; Lu, Nan; Liu, Zhang-Suo (2022): The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 956090. DOI: 10.3389/fimmu.2022.956090.

Hwangbo, Won; Lee, Jeong Hyeon; Ahn, Sangjeong; Kim, Seojin; Park, Kyong Hwa; Kim, Chul Hwan; Kim, Insun (2013): EGFR Gene Amplification and Protein Expression in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. In: *Korean journal of pathology* 47 (2), S. 107–115. DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2013.47.2.107.

Isharwal, Sumit; Audenet, François; Drill, Esther; Pietzak, Eugene J.; Iyer, Gopa; Ostrovnaya, Irina *et al.* (2019): Prognostic Value of TERT Alterations, Mutational and Copy Number Alterations Burden in Urothelial Carcinoma. In: *European urology focus* 5 (2), S. 201–204. DOI: 10.1016/j.euf.2017.07.004.

Iyer, G.; Tully, C. M.; Zabor, E. C.; Bochner, B. H.; Dalbagni, G.; Herr, H. W. *et al.* (2020): Neoadjuvant Gemcitabine-Cisplatin plus Radical Cystectomy-Pelvic Lymph Node Dissection for Muscle-Invasive Bladder Cancer: a 12-year experience. In: *Clinical genitourinary cancer* 18 (5), S. 387–394. DOI: 10.1016/j.clgc.2020.02.014.

Jong, Joep J. de; Stoop, Hans; Nieboer, Daan; Boormans, Joost L.; van Leenders, Geert J. L. H. (2018): Concordance of PD-L1 expression in matched urothelial bladder cancer specimens. In: *Histopathology* 73 (6), S. 983–989. DOI: 10.1111/his.13710.

Kamoun, Aurélie; Reyniès, Aurélien de; Allory, Yves; Sjödahl, Gottfrid; Robertson, A. Gordon; Seiler, Roland *et al.* (2018): The consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer.

Kamoun, Aurélie; Reyniès, Aurélien de; Allory, Yves; Sjödahl, Gottfrid; Robertson, A. Gordon; Seiler, Roland *et al.* (2020): A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. In: *European urology* 77 (4), S. 420–433. DOI: 10.1016/j.eururo.2019.09.006.

Kanyılmaz, Gül; Yavuz, Berrin Benli; Aktan, Meryem; Karaağaç, Mustafa; Uyar, Mehmet; Fındık, Sıddıka (2019): Prognostic Importance of Ki-67 in Breast Cancer and Its Relationship with Other Prognostic Factors. In: *European journal of breast health* 15 (4), S. 256–261. DOI: 10.5152/ejbh.2019.4778.

Kim, Do Kyung; Kim, Jong Won; Ro, Jae Y.; Lee, Hye Sun; Park, Ju-Young; Ahn, Hyun Kyu *et al.* (2020): Plasmacytoid Variant Urothelial Carcinoma of the Bladder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinicopathological Features and Survival Outcomes. In: *The Journal of urology* 204 (2), S. 215–223. DOI: 10.1097/JU.0000000000000794.

Kim, Myong; Jeong, Chang Wook; Kwak, Cheol; Kim, Hyeon Hoe; Ku, Ja Hyeon (2015): Are urothelial carcinomas of the upper urinary tract a distinct entity from urothelial carcinomas of the urinary bladder? Behavior of urothelial carcinoma after radical surgery with respect to anatomical location: a case control study. In: *BMC cancer* 15, S. 149. DOI: 10.1186/s12885-015-1161-9.

Kim, Sung Han; Ho, Jin-Nyoung; Jin, Hyunjin; Lee, Sang Chul; Lee, Sang Eun; Hong, Sung-Kyu *et al.* (2016): Upregulated expression of BCL2, MCM7, and CCNE1 indicate cisplatin-resistance in the set of two human bladder cancer cell lines: T24 cisplatin sensitive and T24R2 cisplatin resistant bladder cancer cell lines. In: *Investigative and Clinical Urology* 57 (1), S. 63–72. DOI: 10.4111/icu.2016.57.1.63.

Kinde, Isaac; Munari, Enrico; Faraj, Sheila F.; Hruban, Ralph H.; Schoenberg, Mark; Bivalacqua, Trinity *et al.* (2013): TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. In: *Cancer research* 73 (24), S. 7162–7167. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2498.

Klaile, Yvonne; Schlack, Katrin; Boegemann, Martin; Steinestel, Julie; Schrader, Andres Jan; Krabbe, Laura-Maria (2016): Variant histology in bladder cancer: how it should change the management in non-muscle invasive and muscle invasive disease? In: *Translational andrology and urology* 5 (5), S. 692–701. DOI: 10.21037/tau.2016.06.13.

Klümper, Niklas; Tran, Ngoc Khanh; Zschäbitz, Stefanie; Hahn, Oliver; Büttner, Thomas; Roghmann, Florian *et al.* (2024): NECTIN4 Amplification Is Frequent in Solid Tumors and Predicts Enfortumab Vedotin Response in Metastatic Urothelial Cancer. In: *JCO* 42 (20), S. 2446–2455. DOI: 10.1200/JCO.23.01983.

Knowles, Margaret A.; Hurst, Carolyn D. (2015): Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (1), S. 25–41. DOI: 10.1038/nrc3817.

Koga, Fumitaka; Takemura, Kosuke; Fukushima, Hiroshi (2018): Biomarkers for Predicting Clinical Outcomes of Chemoradiation-Based Bladder Preservation Therapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092777.

Koll, Florestan J.; Döring, Claudia; Herwig, Leon; Hoeh, Benedikt; Wenzel, Mike; Cano Garcia, Cristina *et al.* (2023): Impact of consensus molecular subtypes on survival with and without adjuvant chemotherapy in muscle-invasive urothelial bladder cancer. In: *Journal of clinical pathology*. DOI: 10.1136/jcp-2023-208973.

Kononen, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Bärlund, M.; Schraml, P.; Leighton, S. *et al.* (1998): *Tissue microarrays* for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. In: *Nature medicine* 4 (7), S. 844–847. DOI: 10.1038/nm0798-844.

Korkolopoulou, Penelope; Lazaris, Andreas Ch; Konstantinidou, Anastasia-E; Kavantzas, Nikolaos; Patsouris, Efstratios; Christodoulou, Panayota *et al.* (2002): Differential expression of

bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival. In: *European urology* 41 (3), S. 274–283. DOI: 10.1016/s0302-2838(02)00003-9.

Kouchkovsky, Ivan de; Zhang, Li; Philip, Errol J.; Wright, Francis; Kim, Daniel M.; Natesan, Divya *et al.* (2021): TERT promoter mutations and other prognostic factors in patients with advanced urothelial carcinoma treated with an immune checkpoint inhibitor. In: *Journal for Immunotherapy of Cancer* 9 (5). DOI: 10.1136/jitc-2020-002127.

Kurtis, Boaz; Zhuge, Jian; Ojaimi, Caroline; Ye, Fei; Cai, Dongming; Zhang, David *et al.* (2016): Recurrent TERT promoter mutations in urothelial carcinoma and potential clinical applications. In: *Annals of diagnostic pathology* 21, S. 7–11. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2015.12.002.

Kwon, Nyoun Soo; Kim, Dong-Seok; Yun, Hye-Young (2017): Leucine-rich glioma inactivated 3: integrative analyses support its prognostic role in glioma. In: *Oncotargets and therapy* 10, S. 2721–2728. DOI: 10.2147/OTT.S138912.

Kyriazis, A. A.; Kyriazis, A. P.; McCombs, W. B.; Peterson, W. D. (1984): Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice. In: *Cancer research* 44 (9), S. 3997–4005.

Lenis, Andrew T.; Lec, Patrick M.; Chamie, Karim; Mshs, M. D. (2020): Bladder Cancer: A Review. In: *JAMA* 324 (19), S. 1980–1991. DOI: 10.1001/jama.2020.17598.

Lerner, Seth P.; McConkey, David J.; Hoadley, Katherine A.; Chan, Keith S.; Kim, William Y.; Radvanyi, François *et al.* (2016): Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting. In: *Bladder cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2 (1), S. 37–47. DOI: 10.3233/BLC-150037.

Lindner, Andrea Katharina; Schachtner, Gert; Tulchiner, Gennadi; Thurnher, Martin; Untergasser, Gerold; Obrist, Peter *et al.* (2021): Lynch Syndrome: Its Impact on Urothelial Carcinoma. In: *International journal of molecular sciences* 22 (2). DOI: 10.3390/ijms22020531.

Liu, K.; Schoonmaker, M. M.; Levine, B. L.; June, C. H.; Hodes, R. J.; Weng, N. P. (1999): Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9), S. 5147–5152. DOI: 10.1073/pnas.96.9.5147.

Long, Xingbo; Zu, Xiongbing; Li, Yuan; He, Wei; Hu, Xiheng; Tong, Shiyu *et al.* (2016): Epidermal Growth Factor Receptor and Ki-67 as Predictive Biomarkers Identify Patients Who Will Be More Sensitive to Intravesical Instillations for the Prevention of Bladder Cancer Recurrence after Radical Nephroureterectomy. In: *PLOS ONE* 11 (11), e0166884. DOI: 10.1371/journal.pone.0166884.

- Lopez-Beltran, Antonio; Henriques, Vanessa; Montironi, Rodolfo; Cimadamore, Alessia; Raspollini, Maria R.; Cheng, Liang (2019): Variants and new entities of bladder cancer. In: *Histopathology* 74 (1), S. 77–96. DOI: 10.1111/his.13752.
- Louis, Chrystal U.; Savoldo, Barbara; Dotti, Gianpietro; Pule, Martin; Yvon, Eric; Myers, G. Doug *et al.* (2011): Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. In: *Blood* 118 (23), S. 6050–6056. DOI: 10.1182/blood-2011-05-354449.
- Maciejowski, John; Lange, Titia de (2017): Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (3), S. 175–186. DOI: 10.1038/nrm.2016.171.
- Marshall, C. J.; Franks, L. M.; Carbonell, A. W. (1977): Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. In: *Journal of the National Cancer Institute* 58 (6), S. 1743–1751. DOI: 10.1093/jnci/58.6.1743.
- Marzouka, Nour-Al-Dain; Eriksson, Pontus; Rovira, Carlos; Liedberg, Fredrik; Sjödahl, Gottfrid; Höglund, Mattias (2018): A validation and extended description of the Lund taxonomy for urothelial carcinoma using the TCGA cohort. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 3737. DOI: 10.1038/s41598-018-22126-x.
- Matulay, Justin T.; Narayan, Vikram M.; Kamat, Ashish M. (2019): Clinical and Genomic Considerations for Variant Histology in Bladder Cancer. In: *Current oncology reports* 21 (3), S. 23. DOI: 10.1007/s11912-019-0772-8.
- McCartan, Damian; Bolger, Jarlath C.; Fagan, Aílis; Byrne, Christopher; Hao, Yuan; Qin, Li *et al.* (2012): Global characterization of the SRC-1 transcriptome identifies ADAM22 as an ER-independent mediator of endocrine-resistant breast cancer. In: *Cancer research* 72 (1), S. 220–229. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1976.
- Miyazaki, Jun; Nishiyama, Hiroyuki (2017): Epidemiology of urothelial carcinoma. In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 24 (10), S. 730–734. DOI: 10.1111/iju.13376.
- Muthigi, Akhil; George, Arvin K.; Brancato, Sam J.; Agarwal, Piyush K. (2016): Novel immunotherapeutic approaches to the treatment of urothelial carcinoma. In: *Therapeutic advances in urology* 8 (3), S. 203–214. DOI: 10.1177/1756287216628784.
- Necchi, Andrea; Anichini, Andrea; Raggi, Daniele; Briganti, Alberto; Massa, Simona; Lucianò, Roberta *et al.* (2018): Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label,

Single-Arm, Phase II Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (34), S. 3353–3360. DOI: 10.1200/JCO.18.01148.

Nelson, Blessie Elizabeth; Hong, Angelina; Jana, Bagi (2021): Elucidation of Novel Molecular Targets for Therapeutic Strategies in Urothelial Carcinoma: A Literature Review. In: *Frontiers in oncology* 11, S. 705294. DOI: 10.3389/fonc.2021.705294.

Nguyen, Kathryn T. T. T.; Wong, Judy M. Y. (2020): Telomerase Biogenesis and Activities from the Perspective of Its Direct Interacting Partners. In: *Cancers* 12 (6). DOI: 10.3390/cancers12061679.

Ohl, Falk; Jung, Monika; Radonić, Aleksandar; Sachs, Markus; Loening, Stefan A.; Jung, Klaus (2006): Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. In: *Journal of Urology* 175 (5), S. 1915–1920. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)00919-5.

Optimus - Studie. An Umbrella Study to Determine the Safety and Efficacy of Various Monotherapy or Combination Therapies in Neoadjuvant Urothelial Carcinoma (Optimus) (2024) (NCT04586244). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04586244>, zuletzt aktualisiert am 13.02.2024, zuletzt geprüft am 31.10.2024.

O'Toole, C.; Nayak, S.; Price, Z.; Gilbert, W. H.; Waisman, J. (1976): A cell line (SCABER) derived from squamous cell carcinoma of the human urinary bladder. In: *International journal of cancer* 17 (6), S. 707–714. DOI: 10.1002/ijc.2910170604.

O'Toole, C.; Price, Z. H.; Ohnuki, Y.; Unsgaard, B. (1978): Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. In: *British journal of cancer* 38 (1), S. 64–76. DOI: 10.1038/bjc.1978.164.

Ou, Zhenyu; Li, Kai; Yang, Ting; Dai, Ying; Chandra, Mohan; Ning, Jun *et al.* (2020): Detection of bladder cancer using urinary cell-free DNA and cellular DNA. In: *Clinical and translational medicine* 9 (1), S. 4. DOI: 10.1186/s40169-020-0257-2.

Peyton, Charles C.; Tang, Dominic; Reich, Richard R.; Azizi, Mounsf; Chipollini, Juan; Pow-Sang, Julio M. *et al.* (2018): Downstaging and Survival Outcomes Associated With Neoadjuvant Chemotherapy Regimens Among Patients Treated With Cystectomy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. In: *JAMA Oncology* 4 (11), S. 1535–1542. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.3542.

Pich, Achille; Chiusa, Luigi; Formiconi, Andrea; Galliano, Diego; Bortolin, Paola; Comino, Alberto; Navone, Roberto (2002): Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder. In: *Cancer* 95 (4), S. 784–790. DOI: 10.1002/cncr.10733.

- Potharaju, Mahadev; Mathavan, Anugraha; Mangaleswaran, Balamurugan; Patil, Sushama; John, Reginald; Ghosh, Siddhartha *et al.* (2019): Clinicopathological Analysis of HIF-1alpha and TERT on Survival Outcome in Glioblastoma Patients: A Prospective, Single Institution Study. In: *Journal of Cancer* 10 (11), S. 2397–2406. DOI: 10.7150/jca.32909.
- Pourebrahimi, Elham; Moradi Tabriz, Hedieh; Miratashi Yazdi, Seyed Amir; Nazar, Elham; Batmani, Sara (2022): The value of BCL2 and CK20 expression in predicting behavioral patterns of bladder cancer, a cross sectional study. In: *Annals of medicine and surgery (2012)* 81, S. 104372. DOI: 10.1016/j.amsu.2022.104372.
- Powles, Thomas; Valderrama, Begoña P.; Gupta, Shilpa; Bedke, Jens; Kikuchi, Eiji; Hoffman-Censits, Jean *et al.* (2024): Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab in Untreated Advanced Urothelial Cancer. In: *The New England journal of medicine* 390 (10), S. 875–888. DOI: 10.1056/NEJMoa2312117.
- Rasheed, S.; Gardner, M. B.; Rongey, R. W.; Nelson-Rees, W. A.; Arnstein, P. (1977): Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. In: *Journal of the National Cancer Institute* 58 (4), S. 881–890. DOI: 10.1093/jnci/58.4.881.
- Reiswich, Viktor; Gorbokon, Natalia; Luebke, Andreas M.; Burandt, Eike; Menz, Anne; Kluth, Martina *et al.* (2021): Pattern of placental alkaline phosphatase (PLAP) expression in human tumors: a tissue microarray study on 12,381 tumors. In: *The journal of pathology. Clinical research* 7 (6), S. 577–589. DOI: 10.1002/cjp2.237.
- Richter, Kirsten; Agnelli, Paola; Oxenius, Annette (2010): On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. In: *International immunology* 22 (1), S. 13–23. DOI: 10.1093/intimm/dxp107.
- Rigby, C. C.; Franks, L. M. (1970): A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. In: *British journal of cancer* 24 (4), S. 746–754. DOI: 10.1038/bjc.1970.89.
- Robertson, A. Gordon; Kim, Jaegil; Al-Ahmadie, Hikmat; Bellmunt, Joaquim; Guo, Guangwu; Cherniack, Andrew D. *et al.* (2017): Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. In: *Cell* 171 (3), 540-556.e25. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.007.
- Roth, Alexander; Yssel, Hans; Pene, Jerome; Chavez, Elizabeth A.; Schertzer, Mike; Lansdorp, Peter M. *et al.* (2003): Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. In: *Blood* 102 (3), S. 849–857. DOI: 10.1182/blood-2002-07-2015.
- Schallenberg, Simon; Dragomir, Mihnea-Paul; Anders, Philipp; Ebner, Benedikt; Volz, Yannic; Eismann, Lennert *et al.* (2023): Intratumoral Heterogeneity of Molecular Subtypes in Muscle-

invasive Bladder Cancer-An Extensive Multiregional Immunohistochemical Analysis. In: *European urology focus* 9 (5), S. 788–798. DOI: 10.1016/j.euf.2023.03.012.

Scholzen, Thomas; Gerdes, Johannes (2000): The Ki-67 protein: From the known and the unknown. In: *Journal of cellular physiology* 182 (3), S. 311–322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.

Sell, Ville; Ettala, Otto; Montoya Perez, Ileana; Järvinen, Riikka; Pekkarinen, Tarmo; Vaarala, Markku *et al.* (2020): Symptoms and diagnostic delays in bladder cancer with high risk of recurrence: results from a prospective FinnBladder 9 trial. In: *World journal of urology* 38 (4), S. 1001–1007. DOI: 10.1007/s00345-019-02841-4.

Senol, Serkan; Yildirim, Asif; Ceyran, Bahar; Uruc, Fatih; Zemheri, Ebru; Ozkanli, Seyma *et al.* (2015): Prognostic significance of survivin, β-catenin and p53 expression in urothelial carcinoma. In: *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 15 (4), S. 7–14. DOI: 10.17305/bjbms.2015.556.

Shariat, Shahrokh F.; Bolenz, Christian; Godoy, Guilherme; Fradet, Yves; Ashfaq, Raheela; Karakiewicz, Pierre I. *et al.* (2009): Predictive value of combined immunohistochemical markers in patients with pT1 urothelial carcinoma at radical cystectomy. In: *The Journal of urology* 182 (1), 78-84; discussion 84. DOI: 10.1016/j.juro.2009.02.125.

Sharma, Meenal; Yang, Zhiming; Miyamoto, Hiroshi (2019): Immunohistochemistry of immune checkpoint markers PD-1 and PD-L1 in prostate cancer. In: *Medicine* 98 (38), e17257. DOI: 10.1097/MD.00000000000017257.

Sherif, Amir; Hasan, Mudhar N.; Marits, Per; Karlsson, Mona; Winqvist, Ola; Thörn, Magnus (2010): Feasibility of T-cell-based adoptive immunotherapy in the first 12 patients with advanced urothelial urinary bladder cancer. Preliminary data on a new immunologic treatment based on the sentinel node concept. In: *European urology* 58 (1), S. 105–111. DOI: 10.1016/j.eururo.2009.09.026.

Sholklapper, Tamir; Bukavina, Laura; Correa, Andres; Kutikov, Alexander; Abbosh, Philip (2023): MP22-14 LAG3 EXPRESSION ASSOCIATED WITH SURVIVAL IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER. In: *Journal of Urology* 209 (Supplement 4). DOI: 10.1097/JU.0000000000003247.14.

Siegel, Rebecca L.; Miller, Kimberly D.; Wagle, Nikita Sandeep; Jemal, Ahmedin (2023): Cancer statistics, 2023. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 73 (1), S. 17–48. DOI: 10.3322/caac.21763.

Simon, Ronald; Sauter, Guido (2002): *Tissue microarrays* for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. In: *Experimental hematology* 30 (12), S. 1365–1372. DOI: 10.1016/s0301-472x(02)00965-7.

Sjödahl, Gottfrid; Eriksson, Pontus; Liedberg, Fredrik; Höglund, Mattias (2017): Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. In: *The Journal of Pathology* 242 (1), S. 113–125. DOI: 10.1002/path.4886.

Sjödahl, Gottfrid; Jackson, Chelsea L.; Bartlett, John Ms; Siemens, D. Robert; Berman, David M. (2019): Molecular profiling in muscle-invasive bladder cancer: more than the sum of its parts. In: *The Journal of Pathology* 247 (5), S. 563–573. DOI: 10.1002/path.5230.

Sjödahl, Gottfrid; Lauss, Martin; Lövgren, Kristina; Chebil, Gunilla; Gudjonsson, Sigurdur; Veerla, Srinivas *et al.* (2012): A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (12), S. 3377–3386. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T.

Smith, Tim A. D.; AbdelKareem, Omneya A.; Irlam-Jones, Joely J.; Lane, Brian; Valentine, Helen; Bibby, Becky A. S. *et al.* (2020): Selection of endogenous control genes for normalising gene expression data derived from formalin-fixed paraffin-embedded tumour tissue. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 17258. DOI: 10.1038/s41598-020-74380-7.

Sobel, Richard E.; Wang, Yuzhuo; Sadar, Marianne D. (2006): Molecular analysis and characterization of PrEC, commercially available prostate epithelial cells. In: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 42 (1-2), S. 33–39. DOI: 10.1007/s11626-006-0009-7.

Song, Dongkui; Powles, Thomas; Shi, Lei; Zhang, Lirong; Ingersoll, Molly A.; Lu, Yong-Jie (2019): Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches. In: *The Journal of Pathology* 249 (2), S. 151–165. DOI: 10.1002/path.5306.

Stillfried, Saskia von; Boor, Peter (2021): Entwicklung eines kooperativen Obduktionsnetzwerks aus Pathologie, Neuropathologie und Rechtsmedizin. In: *Der Pathologe* 42 (Suppl 2), S. 129–134. DOI: 10.1007/s00292-021-01004-w.

Subcellular - TERT - The Human Protein Atlas (2023). Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164362-TERT/subcellular>, zuletzt aktualisiert am 02.07.2023, zuletzt geprüft am 02.07.2023.

Sung, Hyuna; Ferlay, Jacques; Siegel, Rebecca L.; Laversanne, Mathieu; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN

Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 71 (3), S. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.

Taniuchi, Ichiro (2018): CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. In: *Annual review of immunology* 36, S. 579–601. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053411.

TCGA (2014): Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. In: *Nature* 507 (7492), S. 315–322. DOI: 10.1038/nature12965.

TERT | UniProtKB | UniProt (2023). Online verfügbar unter
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/O14746/entry>, zuletzt aktualisiert am 30.06.2023, zuletzt geprüft am 02.07.2023.

Thanan, Raynoo; Murata, Mariko; Ma, Ning; Hammam, Olfat; Wishahi, Mohamed; El Leithy, Tarek *et al.* (2012): Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. In: *Mediators of inflammation* 2012, S. 165879. DOI: 10.1155/2012/165879.

The Human Protein Atlas - ADAM22. Online verfügbar unter
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000008277-ADAM22>, zuletzt geprüft am 13.08.2023.

The Human Protein Atlas - ALPP. Online verfügbar unter
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000163283-ALPP>, zuletzt geprüft am 13.08.2023.

The Human Protein Atlas - FAM129A. Online verfügbar unter
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135842-NIBAN1/pathology>, zuletzt geprüft am 13.08.2023.

The Human Protein Atlas - LAG3. Online verfügbar unter
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000089692-LAG3>, zuletzt geprüft am 15.09.2023.

The Human Protein Atlas - TBP. Online verfügbar unter
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112592-TBP>, zuletzt geprüft am 26.10.2023.

Thy, Sophia; Hommel, Alexandra; Meneceur, Sarah; Bartkowiak, Anna L.; Schulz, Wolfgang A.; Niegisch, Günter; Hoffmann, Michèle J. (2021): Epigenetic Treatment of Urothelial Carcinoma Cells Sensitizes to Cisplatin Chemotherapy and PARP Inhibitor Treatment. In: *Cancers* 13 (6). DOI: 10.3390/cancers13061376.

Torhorst, J.; Bucher, C.; Kononen, J.; Haas, P.; Zuber, M.; Köchli, O. R. *et al.* (2001): *Tissue microarrays* for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. In: *The American journal of pathology* 159 (6), S. 2249–2256. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63075-1.

Triebel, F.; Jitsukawa, S.; Baixeras, E.; Roman-Roman, S.; Genevee, C.; Viegas-Pequignot, E.; Hercend, T. (1990): LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. In: *The Journal of Experimental Medicine* 171 (5), S. 1393–1405. DOI: 10.1084/jem.171.5.1393.

TROPHY-U-01 Studie. Study of Sacituzumab Govitecan in Participants With Urothelial Cancer That Cannot Be Removed or Has Spread (TROPHY U-01) (2024). Online verfügbar unter <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03547973>, zuletzt aktualisiert am 16.10.2024, zuletzt geprüft am 31.10.2024.

Tzeng, C. C.; Liu, H. S.; Li, C.; Jin, Y. T.; Chen, R. M.; Yang, W. H.; Lin, J. S. (1996): Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. In: *Anticancer research* 16 (4A), S. 1797–1804. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8712703/>.

US Food & Drug Administration. FDA approves enfortumab vedotin-ejfv with pembrolizumab for locally advanced or metastatic urothelial cancer (2023). Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-enfortumab-vedotin-ejfv-pembrolizumab-locally-advanced-or-metastatic-urothelial-cancer>, zuletzt aktualisiert am 15.12.2023, zuletzt geprüft am 31.10.2024.

Voduc, David; Kenney, Challayne; Nielsen, Torsten O. (2008): *Tissue microarrays* in clinical oncology. In: *Seminars in radiation oncology* 18 (2), S. 89–97. DOI: 10.1016/j.semradonc.2007.10.006.

VOLGA - Studie. Treatment combination of Durvalumab, Tremelimumab and Enfortumab Vedotin or Durvalumab and Enfortumab Vedotin in patients with muscle invasive bladder cancer ineligible to cisplatin or who refuse cisplatin - VOLGA (2024) (D910PC00001). Online verfügbar unter <https://www.astrazenecaclinicaltrials.com/study/D910PC00001/>, zuletzt aktualisiert am 01.09.2024, zuletzt geprüft am 31.10.2024.

Weinstein, John N.; Collisson, Eric A.; Mills, Gordon B.; Shaw, Kenna R. Mills; Ozenberger, Brad A.; Ellrott, Kyle *et al.* (2013): The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. In: *Nature genetics* 45 (10), S. 1113–1120. DOI: 10.1038/ng.2764.

Williams, R. D. (1980): Human urologic cancer cell lines. In: *Investigative urology* 17 (5), S. 359–363.

Wittekind, Christian (Hg.) (2010): TNM. Klassifikation maligner Tumoren. International Union against Cancer. 7. Aufl. Somerset: Wiley-Blackwell. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10683281>.

Woldu, Solomon L.; Bagrodia, Aditya; Lotan, Yair (2017): Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. In: *BJU international* 119 (3), S. 371–380. DOI: 10.1111/bju.13760.

Woo, Seng-Ryong; Turnis, Meghan E.; Goldberg, Monica V.; Bankoti, Jaishree; Selby, Mark; Nirschl, Christopher J. *et al.* (2012): Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. In: *Cancer research* 72 (4), S. 917–927. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.

Yamuç, Elif; Barışık, Nagehan Özdemir; Şensu, Sibel; Tarhan, Fatih; Barışık, Cem Cahit (2022): Correlation of REG1A, Claudin 7 and Ki67 expressions with tumor recurrence and prognostic factors in superficial urothelial urinary bladder carcinomas. In: *Indian journal of pathology & microbiology* 65 (2), S. 355–361. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM_914_20.

Yang, Jin; Li, Yuanjie; Liu, Qingqing; Li, Li; Feng, Aozi; Wang, Tianyi *et al.* (2020): Brief introduction of medical database and data mining technology in big data era. In: *Journal of evidence-based medicine* 13 (1), S. 57–69. DOI: 10.1111/jebm.12373.

Yates, David R.; Catto, James W. F. (2013): Distinct patterns and behaviour of urothelial carcinoma with respect to anatomical location: how molecular biomarkers can augment clinico-pathological predictors in upper urinary tract tumours. In: *World journal of urology* 31 (1), S. 21–29. DOI: 10.1007/s00345-012-0946-6.

Yin, Ming; Joshi, Monika; Meijer, Richard P.; Glantz, Michael; Holder, Sheldon; Harvey, Harold A. *et al.* (2016): Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. In: *The Oncologist* 21 (6), S. 708–715. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0440.

Yu, Lei; Li, Zhichao; Mei, Hongbin; Li, Wujiao; Chen, Dong; Liu, Lisa *et al.* (2021): Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells in vitro. In: *Clinical & translational immunology* 10 (2), e1248. DOI: 10.1002/cti2.1248.

Zargar, Homayoun; Espiritu, Patrick N.; Fairey, Adrian S.; Mertens, Laura S.; Dinney, Colin P.; Mir, Maria C. *et al.* (2015): Multicenter assessment of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. In: *European urology* 67 (2), S. 241–249. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.09.007.

Zellweger, Tobias; Günther, Sarah; Zlobec, Inti; Savic, Spasenija; Sauter, Guido; Moch, Holger *et al.* (2009): Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade

prostate cancer. In: *International journal of cancer* 124 (9), S. 2116–2123. DOI: 10.1002/ijc.24174.

Zhu, Naiqiang; Hou, Jingyi; Wu, Yuanhao; Liu, Jinxin; Li, Geng; Zhao, Wenjia *et al.* (2018): Integrated analysis of a competing endogenous RNA network reveals key lncRNAs as potential prognostic biomarkers for human bladder cancer. In: *Medicine* 97 (35), e11887. DOI: 10.1097/MD.00000000000011887.

Zlobec, Inti; Koelzer, Viktor H.; Dawson, Heather; Perren, Aurel; Lugli, Alessandro (2013): Next-generation *tissue microarray* (ngTMA) increases the quality of biomarker studies: an example using CD3, CD8, and CD45RO in the tumor microenvironment of six different solid tumor types. In: *Journal of translational medicine* 11, S. 104. DOI: 10.1186/1479-5876-11-104.

Zvereva, Maria; Pisarev, Eduard; Hosen, Ismail; Kisil, Olga; Matskeplishvili, Simon; Kubareva, Elena *et al.* (2020): Activating Telomerase TERT Promoter Mutations and Their Application for the Detection of Bladder Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 21 (17). DOI: 10.3390/ijms21176034.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation in verschiedener Weise unterstützt und begleitet haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herr Prof Dr. Niegisch, Leiter des Uroonkologischen Zentrums des Universitätsklinikums Düsseldorf, der das Thema dieser Arbeit führend initiiert und mich mit wertvollem Feedback und verlässlicher Unterstützung durch alle Phasen der Dissertation begleitet hat.

Darüber hinaus gilt auch ein großer Dank Frau Dr. Grunewald, welche ebenfalls maßgeblich an der Entwicklung und Ausrichtung dieser Arbeit beteiligt war, für Ihre engagierte Betreuung und hilfreichen Anregungen während der Entstehung dieser.

Herzlichen Dank auch an Frau PD Dr. Hoffmann für die stetige Begleitung im Labor, das Heranführen an die experimentelle Forschung und die wissenschaftliche Denkweise sowie für Ihre wertvollen Hinweise in der Erstellung des Manuskripts.

Auf Seiten des Institutes der Pathologie wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht ohne das Engagement von Frau Prof. Esposito im Rahmen der Co-Betreuung möglich gewesen. Auch Frau Dr. Lopez-Cotarelo und Frau Dr. Preetz möchte ich danken, diese waren für fachliche Rückfragen stets ansprechbar und haben mit Ihrer praktischen Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ein besonderer Dank auch nochmals an Frau Dr. Preetz für das Teilen Ihres Arbeitsraumes sowie Ihre stetigen Ermutigungen.

Frau Hader, Frau Klaßen und Frau Schneeloch danke ich für Ihre aufgebrachte Zeit und fachliche sowie praktische Mitwirkung.

Besonderer Dank gilt auch meiner Schwester für Ihren Rückhalt, Ihre stetige Bestärkung und meinen Eltern, für Ihre bedingungslose Unterstützung, Förderung und Glauben an mich während des gesamten Weges.