

Aus der Klinik für Urologie  
(Prof. Dr. med. L. Trojan)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**EXPRESSION VON RANK / RANKL IM HARNBLASENKARZINOM**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Rena Hinrika Waegner**  
aus  
Paderborn

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. L. Trojan

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2015

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	- 1 -
1.1	Das Harnblasenkarzinom .....	- 1 -
1.1.1	Epidemiologie, Inzidenz und Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms.....	- 1 -
1.1.2	Pathogenese und Molekularbiologie des Urothelkarzinoms .....	- 3 -
1.1.3	Allgemeine und pathologische Histologie und histologische Klassifikation....	- 5 -
1.1.4	Metastasierungswahrscheinlichkeiten und Metastasierungswege .....	- 8 -
1.1.5	Therapie des Harnblasenkarzinoms .....	- 8 -
1.2	RANK-RANKL-OPG-Pathway .....	- 11 -
1.2.1	Der gesunde Knochenstoffwechsel .....	- 11 -
1.2.2	Biochemischer Ablauf der Interaktion im Detail .....	- 13 -
1.2.3	OPG-RANKL-Komplex.....	- 15 -
2	Ziel der Studie und Fragestellung.....	- 16 -
3	Material und Methoden.....	- 17 -
3.1	Erstellung des Kollektivs und Beschreibung des allgemeinen Ablaufs .....	- 17 -
3.2	Das Patientenkollektiv.....	- 17 -
3.3	Herstellung der Schnittpräparate .....	- 20 -
3.4	Färbung Hämatoxylin-Eosin .....	- 20 -
3.5	Immunhistochemie .....	- 20 -
3.6	Auswertung der Immunhistochemie mittels Allred-Score.....	- 21 -
3.7	Datenerfassung und statistische Auswertung .....	- 23 -
4	Ergebnisse.....	- 24 -
4.1	Datenquelle und Stammblatt .....	- 24 -
4.2	Auswertung der immunhistochemischen Befunde.....	- 25 -
4.2.1	Mikroskopische Auswertung.....	- 25 -
4.2.2	Repräsentative Abbildungen aller drei Färbungen.....	- 26 -
4.3	Statistische Korrelationen der Expressionen.....	- 36 -

4.4	Präsentation der Ergebnisse .....	- 37 -
4.4.1	Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von RANK .....	- 37 -
4.4.2	Beschreibung der Ergebnisse der Expression von RANK .....	- 43 -
4.4.3	Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von RANKL.....	- 45 -
4.4.4	Beschreibung der Ergebnisse der Expression von RANKL.....	- 51 -
4.4.5	Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von OPG .....	- 53 -
4.4.6	Beschreibung der Ergebnisse der Expression von OPG .....	- 58 -
5	Diskussion.....	- 60 -
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	- 77 -
6.1	Zusammenfassung .....	- 77 -
6.2	Ausblick .....	- 78 -
7	Anhang.....	- 80 -
7.1	Tabellen.....	- 80 -
8	Verzeichnisse .....	- 87 -
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	- 87 -
8.2	Literaturverzeichnis.....	- 88 -
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	- 94 -
8.4	Tabellenverzeichnis.....	- 95 -

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie, Inzidenz und Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms

#### 1.1.1.1 Epidemiologie und Inzidenz

Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste Tumor des Urogenitaltraktes beim Menschen. In Deutschland erkranken jährlich etwa 16.000 Menschen an einem invasiven Harnblasenkarzinom, hinzu kommen weitere 13.000 Patienten mit Neubildungen unklarer Genese des Harnblasentraktes (in situ oder unsicheren Verhaltens). In 95 % der Fälle handelt es sich um ein Urothelkarzinom. Die Verteilung der invasiven Harnblasenkarzinome auf beide Geschlechter liegt etwa bei 75 % erkrankter Männer und 25 % erkrankter Frauen (73,2 % zu 26,7 %).

Im Jahr 2010 bildete das Harnblasenkarzinom beim Mann einen prozentualen Anteil von 4,5 % aller Krebsneuerkrankungen und belegt damit die vierte Stelle in der Gesamtstatistik. Bei der Frau ist es mit einer Gesamtinzidenz von 1,8 % deutlich seltener und steht hier an 14. Stelle. Entsprechend der Verteilung der Neuerkrankungen verhält es sich auch mit dem Anteil der Mortalität durch das Harnblasenkarzinom an der Gesamtmortalität durch Tumorerkrankungen: 4,6 % (Rang 10) beim Mann und 2,0 % (Rang 14) bei der Frau.

Der Häufigkeitsgipfel beider Geschlechter liegt zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr, das mittlere Erkrankungsalter liegt beim Mann bei 73 Jahren, bei der Frau bei 77 Jahren (=Median des Alters bei Diagnosestellung). Männer haben derzeit ein Lebenszeitrisiko von 2,6 % zu erkranken, Frauen dagegen haben ein Lebenszeitrisiko von nur 0,9 %.

Da die Mehrheit der Patienten jenseits des 70. Lebensjahr liegt, ist in Anbetracht des demographischen Wandels in Deutschland derzeit von einer zunehmenden Inzidenz auszugehen, obwohl an sich die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten bei Männern deutlich rückläufig sind. Dies liegt möglicherweise an der reduzierten Exposition gegenüber verschiedenen Kanzerogenen und am Rückgang des Tabakkonsums (Hiddemann und Bartram 2010).

Die Häufigkeit von urothelialen Karzinomen korreliert im Hinblick auf die Lokalisation im gesamten Urogenitaltrakt mit der Verteilung des Urothels, dementsprechend finden sich über 90 % in der Harnblase selbst. Die internationale Häufigkeitsverteilung sollte differenziert betrachtet werden, da die Einteilung der Diagnosen nach ICD-10 für das Harnblasenkarzinom

in anderen Ländern von der hier gebräuchlichen abweicht (Robert Koch-Institut 2010). Nach den Angaben des Robert Koch-Instituts rangiert die Anzahl der Neuerkrankungen des Harnblasenkarzinoms in Deutschland im internationalen Vergleich für den Mann an 11. Stelle und für die Frau an 9. Stelle. Dieses bedeutet, dass in zehn bzw. acht Ländern dieses Vergleichs eine höhere Inzidenz vorliegt. Es werden hier europäische Länder und die USA zusammengefasst. (Robert Koch-Institut 2010; Robert Koch-Institut 2013; Hiddemann und Bartram 2010)

#### 1.1.1.2 Risikofaktoren

Als gesicherte Risikofaktoren, welche zur Entstehung eines Harnblasenkarzinoms beitragen können, gelten Zigarettenrauch, chemische Kanzerogene und chronische Infektionen.

Raucher haben gegenüber Nichtrauchern ein um den Faktor 3 gesteigertes relatives Risiko, an einem Urothelkarzinom zu erkranken. Dabei besteht eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl konsumierter Zigaretten, der Konsumdauer sowie dem Inhalationsgrad und der Ausbildung einer Neoplasie. Es stellt sich als erwiesen dar, dass nicht nur aktives Rauchen, sondern auch passives Rauchen das Risiko steigert, während andere Formen des Tabakkonsums – wie beispielsweise das Kauen von Tabak – keine positiven Korrelationen aufweisen. (Hiddemann und Bartram 2010; Robert Koch-Institut 2013)

Als gesicherte chemische Kanzerogene gelten aromatische Amine. Zu den gefährdeten beruflichen Gruppen gehören Mitarbeiter der Chemieindustrie, aber auch Personal, welches Aluminium, Textil, Gummi oder Farbe verarbeitet. Ebenfalls als gefährdend gelten Bergwerke und Kokereien. Durch oft lange Expositions- und Latenzzeiten wird jedoch die Zuordnung von direkter Ursache und Wirkung erschwert. Generell ist es zwar möglich, bei entsprechendem Nachweis über eine dauerhafte Exposition eine Anerkennung einer Berufskrankheit zu erlangen, jedoch gelingt dieses nur in sehr seltenen Fällen. Es handelt sich hierbei um die BK1301 – Schleimhautveränderungen, Krebs oder andere Neubildungen der Harnwege durch aromatische Amine.

Laut Cole et al. (1972) ist die berufliche Belastung durch chemische Kanzerogene für knapp 25 % der Harnblasentumoren verantwortlich, während das Zigarettenrauchen für bis zu 50 % der Harnblasentumoren beim Mann verantwortlich gemacht wird. (Hiddemann und Bartram 2010; Sökeland et al. 2004; Cole et al. 1972)

Neben Zigarettenrauchen und aromatischen Aminen zählen auch chronische Infektionen zu den Risikofaktoren der Entstehung eines Harnblasenkarzinoms. Nach Wynder und Stellman (1977) gilt als zusätzliche Belastung die Kombination von Irritationen des Urothels - vermittelt durch Harnblasensteine oder das Vorliegen eines Dauerkatheters - und einer Infektion. Es gilt noch zu klären, inwieweit die Nitrosamine, welche bei Infektionen der Blase gebildet werden, ursächlich zur Tumorentstehung beitragen. Weitere prädisponierende chronische Erkrankungen der Blase sind die Bilharziose (Infektion mit *Schistosoma haematobium*) und die Balkanephritis, wobei die Bilharziose vermehrt zu Plattenepithelkarzinomen führt. (Lindemann-Docter und Knüchel 2008; Hiddemann und Bartram 2010; Wynder und Stellman 1977)

### 1.1.2 Pathogenese und Molekularbiologie des Urothelkarzinoms

Bei der molekulargenetischen Tumorgenese des Urothelkarzinoms geht man von einem stufenweisen Prozess aus, in dessen Rahmen sich die genetischen Abweichungen summieren. Eine Einteilung in gut und schlecht differenzierte Karzinome ist möglich und sinnvoll:

→ Bei dem gut differenzierten Urothelkarzinom handelt es sich um die papilläre Form. Diese ist genetisch stabil und in der Regel nicht-invasiv. Sie wird als pTa ‚low grade‘ (LG) bezeichnet und macht etwa 70-80 % aus.

→ Bei dem schlecht differenzierten Urothelkarzinom handelt es sich um flache oder solide Tumoren. Diese sind zumeist genetisch instabil und wachsen frühzeitig invasiv in die Muskulatur der Blase ein. Zu ihnen zählen das Carcinoma in situ (Cis) und die pT1-4 Tumoren.

Die häufigste und frühzeitigste zytologische Veränderung aller, also sowohl papillärer als auch flacher Urothelkarzinome, ist die Deletion vom Chromosom 9 (9p/9q-). Auf diesem Chromosom sind drei Proteine kodiert (P16, P14ARF, P15), die sich physiologischerweise inhibierend auf den Zellzyklus auswirken. Diese Region wird daher auch als multiple Tumorsuppressorgenregion bezeichnet, da die Proteine eine überschießende Zellproliferation verhindern.

Hinzu kommt bei den flachen, also schlecht differenzierten Karzinomen frühzeitig eine Mutation am Chromosom 17, die zum Verlust des p53-Tumorsuppressorgens führt. Das Protein p53 ist, wie oben genannte Proteine, ursprünglich für die Zellzykluskontrolle zuständig. Bei der Zellteilung im Übergang zwischen der G1- und der S-Phase ermöglicht es durch Verlangsamung der DNA-Replikation eine möglicherweise notwendige Reparatur der

DNA, bei zu stark fehlerhafter DNA führt es zur Apoptose der Zelle. Außerdem induziert p53 die Expression eines weiteren Proteins, welches Angiogenese inhibieren kann (Thrombospondin-1). Der Verlust dieses Gens führt damit sekundär zu einer unselektierten Vermehrung möglicherweise fehlerhafter Zellen.

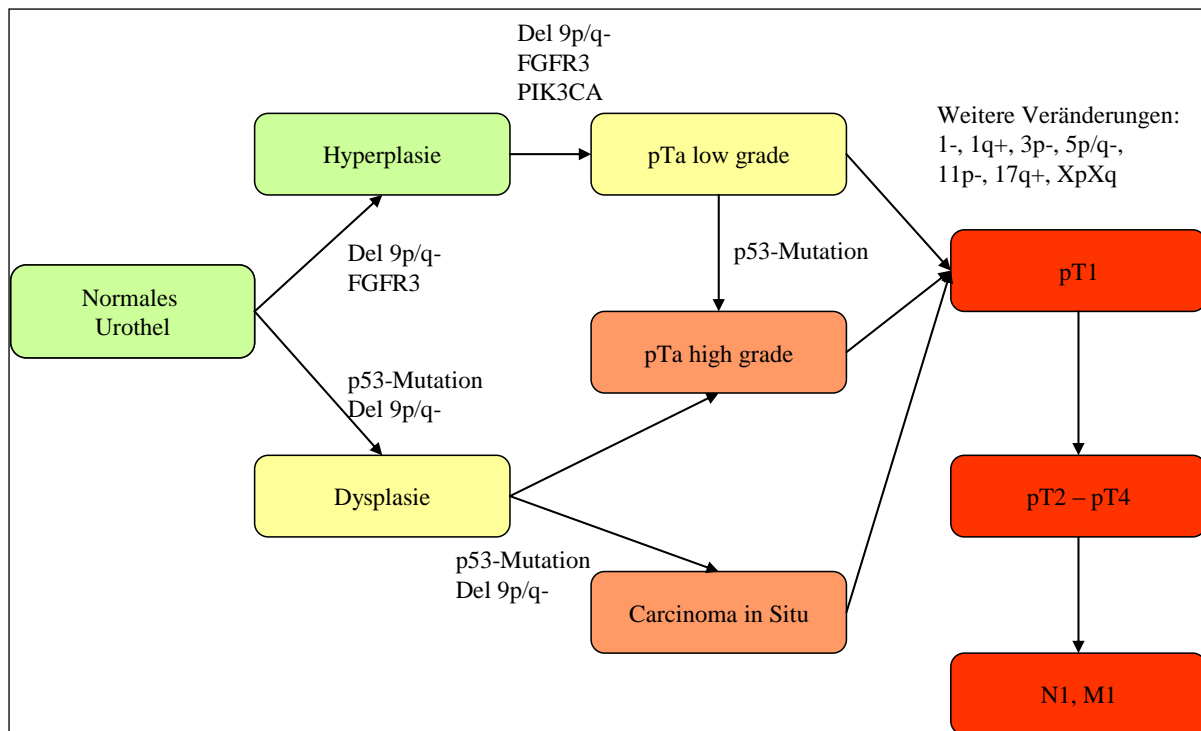
Stattdessen typisch für gut differenzierte papilläre Tumoren ist die Mutation im FGFR3-Gen (Fibroblasten-Wachstums-Rezeptor 3) und im PIK3CA-Gen (Phosphatidylinositol-3-Kinase). Weitere chromosomale Aberrationen kommen auf den Chromosomen 1, 3, 5, 7, 11 und 17 sowie den Gonosomen X und Y vor. Weitere gut untersuchte Gene, welche für die Pathologie von Harnblasenkarzinomen verantwortlich gemacht werden, sind das C-MYC-Onkogen, das C-ERB-B2-Onkogen und das RB-Tumorsuppressorgen.

Eine generelle Besonderheit in der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms ist nicht nur die hohe Rezidivrate, sondern vor allem auch die Multifokalität. Das heißt, dass es vermehrt innerhalb einer Harnblase zu multiplen Tumoren an unterschiedlichen Lokalisationen kommt. Bei über 80 % dieser multifokalen Karzinome ist die Entstehung monoklonal. Dieses bedeutet, dass lediglich eine singuläre Zelle des Urothels eine pathologische Transformation erlebt und aus dieser schließlich der Tumor entsteht. Die Multifokalität entsteht dann durch Abschilferungsvorgänge mit sich anschließender Reimplantation an anderer Stelle.

Dem gegenüber steht die polyklonale Entstehungstheorie, nach welcher es an unterschiedlichen Stellen in einer Blase zu mannigfachen Chromosomenaberrationen kommt, so dass die multifokalen Tumoren alle eine eigene Entstehung aufweisen. Für beide Thesen gibt es richtungweisende Hinweise, so dass davon ausgegangen werden kann, dass beide parallel existieren und zur Entstehung von multifokalen Harnblasenkarzinomen beitragen. (Hiddemann und Bartram 2010)

Zur Verdeutlichung der Komplexität der molekularen Tumorgenese ist die Abbildung 1-1 angeführt, welche die unterschiedlichen Mutationen im Rahmen der Karzinogenese verdeutlichen soll (modifiziert nach: Hiddemann und Bartram 2010 und Lindemann-Docter und Knüchel 2008).





**Abbildung 1-1: Relevante genetische Veränderung bei der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms**

Diese Abbildung, modifiziert nach Lindemann-Docter und Knüchel (2008) und Hiddemann und Bartram (2010), verdeutlicht die Komplexität der molekularen Tumorgenese, indem sie unterschiedliche Mutationen zeigt, welche bei der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms von Bedeutung sind.

### 1.1.3 Allgemeine und pathologische Histologie und histologische Klassifikation

#### 1.1.3.1 Allgemeine Histologie

Das Oberflächenepithel der Harnblase, auch Epithelium transitionale oder Urothel genannt, ist einer besonderen Aufgabe gegenübergestellt: Da die Harnblase als Speicherorgan fungiert, muss sich das Epithel an die unterschiedlichen Füllungsgrade anpassen und somit in der Oberflächenausdehnung ausgesprochen variabel sein. Dieses wird gewährleistet durch einen einzigartigen Aufbau:

Im entleerten Zustand besteht das Urothel aus etwa fünf bis sieben Zellreihen: Außen befinden sich die Basalzellen, mittig die Intermediärzellen und lumenwärts eine Reihe sogenannter *umbrella cells* (Superfizialzellen / Deckzellen). Bei praktisch allen Zellen besteht ein Kontakt zur Basalmembran, weshalb auch von mehrreihigem Epithel gesprochen wird. Die Superfizialzellen sind relativ größer als die Intermediär- und Basalzellen, oft polyploid und besitzen mehrere Zellkerne. Ist die Harnblase entleert, so enthalten sie zahlreiche Vesikel bestehend aus Zelloberfläche, welche bei Bedarf als Oberflächenvergrößerung via Exozytose

in die apikale Membran eingebaut werden. Das Lumen vergrößert sich entsprechend bei zunehmender Füllung mit Endharn. In der maximal gefüllten Blase besteht das Epithel nur noch aus etwa drei Zellreihen, wobei eine Superfizialzelle dann mehrere Intermediärzellen bedeckt. Bei Entleerung der Blase funktioniert der Mechanismus analog: Durch Endozytose werden die Plaques wieder internalisiert und die Zelloberfläche verkleinert sich.

Umgeben ist das Urothel der Harnblase von einer Lamina propria (Bindegewebe) – zusammen stellen sie die Funktionseinheit Mukosa dar. Diese Mukosa ist weitestgehend gut verschieblich gegen die sich anschließende Tunica muscularis mit Ausnahme des Trigonum vesicae, sodass sie im entleerten Zustand lumenwärtsgerichtete Falten aufwirft. (Lüllmann-Rauch 2006, S. 102 und S. 458)

### 1.1.3.2 Histologische Klassifikation und pathologische Histologie

#### 1.1.3.2.1 Klassifikationsmöglichkeiten

Für die Klassifikation von Tumoren gibt es verschiedene Möglichkeiten: Einerseits können sie nach ihrem Ausbreitungsgrad (Staging) und andererseits nach der Differenzierung der veränderten Zelle (Grading) eingeteilt werden. Hilfreich sind diese Arten der Einteilung für eine optimierte und angepasste Therapie, genauso wie für eine Einschätzung der Prognose. Um dieses einheitlich zu gestalten, gibt es zum Staging die TNM-Klassifikation der Harnblasenkarzinome (s. Tabelle 7-1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms). Diese Klassifikation gibt unter anderem Auskunft über die Infiltrationstiefe des Primärtumors, das Vorliegen von Fernmetastasen, den Befall von Lymphknoten oder über die Lymph- und Blutgefäßinvasion.

Im Hinblick auf das Grading gibt es eine Klassifikation urothelialer Tumoren, welche von der WHO aufgestellt wurde. Diese wurde 1973 von Mostofi et al. eingeführt und zuletzt 2004 aktualisiert. Eine detaillierte Gegenüberstellung stellt die veränderte Nomenklatur dar und erläutert, welche Entitäten einander entsprechen (s. Tabelle 7-2: Gegenüberstellung der WHO-Klassifikation von 2004 und 1973). Zusätzlich weisen Urothelneoplasien unabhängig von ihrer Invasivität eine unterschiedliche klinische Relevanz auf (Seitz et al. 2005).

### 1.1.3.2.2 Pathologische Histologie

Die Einteilung des Harnblasenkarzinoms erfolgt anhand des Wachstumsmusters in nicht-invasiv und invasiv. Die für diese Studie relevanten Entitäten sollen an dieser Stelle detailliert beschrieben werden: Das nicht-invasiv wachsende Harnblasenkarzinom pTa (low grade + high grade / G1-G3) und das invasiv wachsende Harnblasenkarzinom pT1-4 (low grade + high grade / G1-G3). Zu den weiteren Entitäten, welche hier nicht näher erläutert werden, gehören unter anderem Hyperplasien, reaktive Atypien und intraurotheliale Neoplasien low grade und high grade (s. Tabelle 7-3: Histologische Pathologien urothelialer Veränderungen nicht-invasiver und invasiver Genese).

#### Nicht-invasive Urothelneoplasien

Nicht-invasive papilläre Harnblasenkarzinome (pTa – low grade + high grade)

- pTa – low grade (G1-G2): Bei den pTa-Tumoren gibt es zwar insgesamt noch ein geordnetes Bild, aber gleichzeitig liegt eine Architekturstörung vor sowie geringgradige Zellatypien. Es rezidivieren etwa 50-70 %, bei weniger als 12 % ist ein Progress in ein invasiveres Urothelkarzinom gegeben. Mit 5 % ist die Mortalität noch eher gering.
- pTa – high grade (G2-G3): Diese pTa-Tumoren haben eine massive Architekturstörung sowie zahlreiche Kernatypien. In 70-75 % kommt es zu einem Rezidiv, bei 15-40 % kommt es zu einem Progress. Die Mortalitätsrate ist mit 20 % bereits deutlich höher als die der pTa-low grade-Tumoren. (Lindemann-Docter und Knüchel 2008; Seitz et al. 2005)

#### Invasive Urothelneoplasien

Invasive Urothelkarzinome (pT1-pT4)

Ein invasives Urothelkarzinom zeichnet sich durch die Infiltration der Lamina propria aus und ist potentiell metastasierungsfähig. Histologisch stellt es sich als sehr heterogen dar, man unterscheidet high grade (HG) versus low grade (LG) bei unterschiedlicher Infiltrationstiefe (pT1 (oberflächlich) - pT4 (muskelinvasiv)). Ob das Karzinom rezidiviert oder einen progredienten Verlauf nimmt, hängt von Faktoren wie der Tumorgöße (>3 cm), der Multifokalität und dem begleitenden Vorliegen eines Cis ab. Als wichtiger prognostischer Faktor dient die Infiltrationstiefe des Karzinoms.

---

Eine besonders schlechte Prognose haben pT4-Karzinome, metastasierte Karzinome (N1/M1) und Karzinome, welche die Ureterostien betreffen. (Lindemann-Docter und Knüchel 2008; Seitz et al. 2005)

#### 1.1.4 Metastasierungswahrscheinlichkeiten und Metastasierungswege

Das Harnblasenkarzinom kann sowohl hämatogen als auch lymphogen metastasieren. Die Metastasierung kann entweder gleichzeitig hämatogen und lymphogen vorliegen oder nur singular ablaufen. In der Mehrheit der Fälle (~50 %) liegt eine zweizeitige Metastasierung vor, was bedeutet, dass sich die Metastasierung in zwei getrennten Phasen entwickelt – es sind dementsprechend sowohl Fernmetastasen als auch Lymphknotenmetastasen vorhanden. Ausschließlich Lymphknotenmetastasen liegen bei etwa 12 % der muskelinvasiven Karzinome vor, während ausschließlich Fernmetastasen bei etwa 10 % auftreten (Ergebnisse von Autopsiestudien). Insgesamt ist der lymphogene Metastasierungswege mit etwa 60 % etwas häufiger als der hämatogene Weg.

Wenn ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom lymphogen metastasiert, so sind in über 90 % die Lymphknoten im kleinen Becken, genauer paravesikal, iliakal und in der Fossa obturatoria, betroffen. In 72 % liegen die betroffenen Lymphknoten retroperitoneal.

Führt das muskelinvasive Karzinom zu hämatogenen Metastasen, so können diese generell in jedem Organ auftreten, bevorzugt aber in der Leber, der Lunge und dem Knochen (s. Tabelle 7-4: Häufigkeit und Lokalisierung der Fernmetastasierung beim Urothelkarzinom).

Um eine Aussage darüber zu treffen, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Infiltration in umliegendes Gewebe oder eine Metastasierung vorliegt, ist es hilfreich, den Grad der Differenzierung heranzuziehen. Hierbei wird die Differenzierung in G1 (hoch differenziert) bis G3 (niedrig differenziert) eingeteilt und entsprechend dieser histopathologischen Einteilung von einer bestimmten prozentualen Häufigkeit von Infiltration und Metastasierung ausgegangen (s. Tabelle 7-5: Differenzierungsgrade und Infiltration / Metastasierung). (Hautmann 2010; Hiddemann und Bartram 2010)

#### 1.1.5 Therapie des Harnblasenkarzinoms

##### 1.1.5.1 Therapie des oberflächlich wachsenden Harnblasenkarzinoms Ta/T1

Die Therapie des oberflächlich und nicht-muskelinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinoms hat in der Regel eine kurative Intention. Der Tumor wird im Rahmen einer transurethralen

Resektion (TUR) mit einer Schlinge, über welche hochfrequenter Strom fließt, komplett abgetragen. Während dieses Eingriffs ist die Harnblase mit einer Spüllösung gefüllt. Zur Kontrolle der vollständigen Entfernung werden Proben am Tumorgrund sowie vom Tumorrand entnommen, welche sich mikroskopisch als tumorfrei darstellen sollten. Außerdem sollte das Tumorpräparat Muskulatur der Harnblase enthalten, um die Infiltrationstiefe sicher beurteilen zu können. Eine Analyse und Bewertung der gesamten Präparate erfolgt durch den Pathologen. Postinterventionell wird empfohlen, eine topische intravesikale Therapie mit beispielsweise dem Chemotherapeutikum Mitomycin C anzuschließen, um auch interventionell abgeschilferte oder eventuell verbliebene Tumorreste zu eliminieren. Zusätzlich gilt die Empfehlung, bei Patienten mit einem Differenzierungsgrad von G2 oder G3 bei pTa-Tumoren sowie einem Nachweis von pT1-Tumoren eine ausgedehnte Rezidivprophylaxe anzuschließen. Diese Rezidivprophylaxe kann ebenfalls intravesikal mit Mitomycin C oder mit BCG (Bacillus-Calmette-Guerin, virulente Tuberkelbakterien) durchgeführt werden, wobei unter der Therapie mit BCG vermehrt Nebenwirkungen (z. B. Dysurie, grippale Symptome oder Übelkeit) auftreten. Für die Häufigkeit und die Dauer dieser Anwendungen stehen verschiedene Schemata zu Verfügung. (Hautmann 2010; Hiddemann und Bartram 2010)

#### 1.1.5.2 Therapie des Carcinoma in situ

Die Therapie des Carcinoma in situ gestaltet sich komplizierter, da es häufig multilokulär auftritt und somit eine einfache operative Therapie wie z. B. die TUR meist nicht ausreichend ist. Hier gilt daher die Empfehlung, postinterventionell (bzw. nach Diagnosestellung) eine Therapie mit BCG anzuschließen. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, eine Therapie mit Mitomycin C anzuschließen, jedoch sind die Erfolge der BCG-Therapie als besser einzustufen. Therapieerfolge sind regelmäßig zu kontrollieren, so dass bei Progredienz der Erkrankung die Therapie ausgebaut werden kann. (Hautmann 2010)

#### 1.1.5.3 Therapie des muskel-invasiv wachsenden Harnblasenkarzinoms pT2, pT3a/b

Die Therapie der Wahl des muskelinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinoms pT2 und pT3a/b ist die radikale Zystektomie. Bei diesem Eingriff in Vollnarkose werden sowohl die Harnblase als auch die regionären Lymphknoten in der Fossa obturatoria und entlang der Iliakalgefäße entfernt. Die Entfernung der Lymphknoten ermöglicht eine Erhebung des Lymphknotenstatus. Dieser Eingriff beinhaltet geschlechtsabhängig noch eine weitere Mitnahme von Organen:

Beim Mann werden zusätzlich die Prostata und die Samenblasen mit entfernt, bei der Frau die vordere Scheidenmanschette und der Uterus. Optional werden bei älteren Frauen in der Postmenopause die Tuben und die Ovarien ebenfalls entfernt, bei jüngeren Frauen hingegen können sie – individuell entschieden – auch belassen werden. Ebenfalls optional kann bei Einhaltung eines Sicherheitsabstandes über den Erhalt der Scheidenmanschette diskutiert werden. Über eine zusätzliche Entfernung der Urethra entscheidet letztlich die Lage des Karzinoms: Kann auch hier ein ausreichender Sicherheitsabstand intraoperativ eingehalten werden, so kann die Urethra belassen werden. Dieses ermöglicht eine vielfältigere Harnableitung beispielsweise im Sinne einer orthotopen Ersatzblasenbildung. Eine operative Rekonstruktion der Harnableitung bzw. Harnspeicherung wird im Anschluss durchgeführt. Beispiele für eine Harnableitung sind die Harnleiter-Darm-Implantierung, das Anfertigen eines Ileum-Conduit oder einer Neoblase. Auf die Rekonstruktionsmöglichkeiten im Detail soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Mit 80 % ist die 5-Jahresüberlebensrate des pT2-Stadiums als hoch einzustufen, aber auch die 5-Jahresüberlebensrate des pT3a/b-Stadiums ist nicht unerheblich, wenn auch schlechter. (Hautmann 2010; Hiddemann und Bartram 2010)

#### 1.1.5.4 Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms

Die Standard-Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms ist eine systemische medikamentöse Chemotherapie, welche nach unterschiedlichen Schemata durchgeführt werden kann, wobei sie sich in ihren Nebenwirkungsprofilen unterscheiden. Die Prognose eines metastasierten Harnblasenkarzinoms ist trotz Therapie mit einer 10-20 %igen 5-Jahresüberlebensrate eher gering. (Hautmann 2010; Hiddemann und Bartram 2010)

Als gesonderter Therapieansatz ist die Metastasen Chirurgie zu nennen, welche unter kurativer Absicht durchgeführt werden kann. Laut einer Zusammenschau mehrerer uroonkologischer Zentren kann mittels dieser zusätzlichen Therapie die 5-Jahresüberlebensrate auf fast 30 % erhöht werden. Für welche Subgruppen von Patienten dieser Ansatz jedoch eine erfolversprechende Option darstellt, ist noch nicht klassifiziert. (Lehmann et al. 2009)

## 1.2 RANK-RANKL-OPG-Pathway

### 1.2.1 Der gesunde Knochenstoffwechsel

Der gesunde Knochen besteht sowohl aus Zellen als auch aus extrazellulärer Matrix. Er ist nicht als statisch anzusehen, sondern vielmehr als vitales Gewebe, welches auch unter physiologischen Bedingungen ständigen Umbauprozessen unterlegen ist.

Zu den Zellen gehören Osteoblasten, welche den Knochen bilden und Osteozyten, welche in sogenannten Howship'schen Lakunen eingemauerten alten Osteoblasten entsprechen. Demgegenüber existieren Osteoklasten, welche den Knochen abbauen. Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus Proteoglykanen und Kollagen, welches durch Kalziumhydroxylapatit mineralisiert wird.

Der gesamte Knochenstoffwechsel resultiert aus einer Balance zwischen Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, welche in vier Phasen eingeteilt werden kann: Aktivierung, Resorption, Umkehrung und Formation. Dieses beinhaltet im Detail die Entfernung von Knochen trabekeln durch die Osteoklasten und die Wiederauffüllung durch Ablagerung neuer Matrix durch die Osteoblasten. Dieses Gleichgewicht zwischen Bildung und Resorption ist sehr empfindlich und kann durch viele pathologische Bedingungen gestört werden. Beispiele hierfür sind unter anderem Osteoporose, Glukokortikoid-induzierter Knochenschwund, das Multiple Myelom und die Rheumatoide Arthritis.

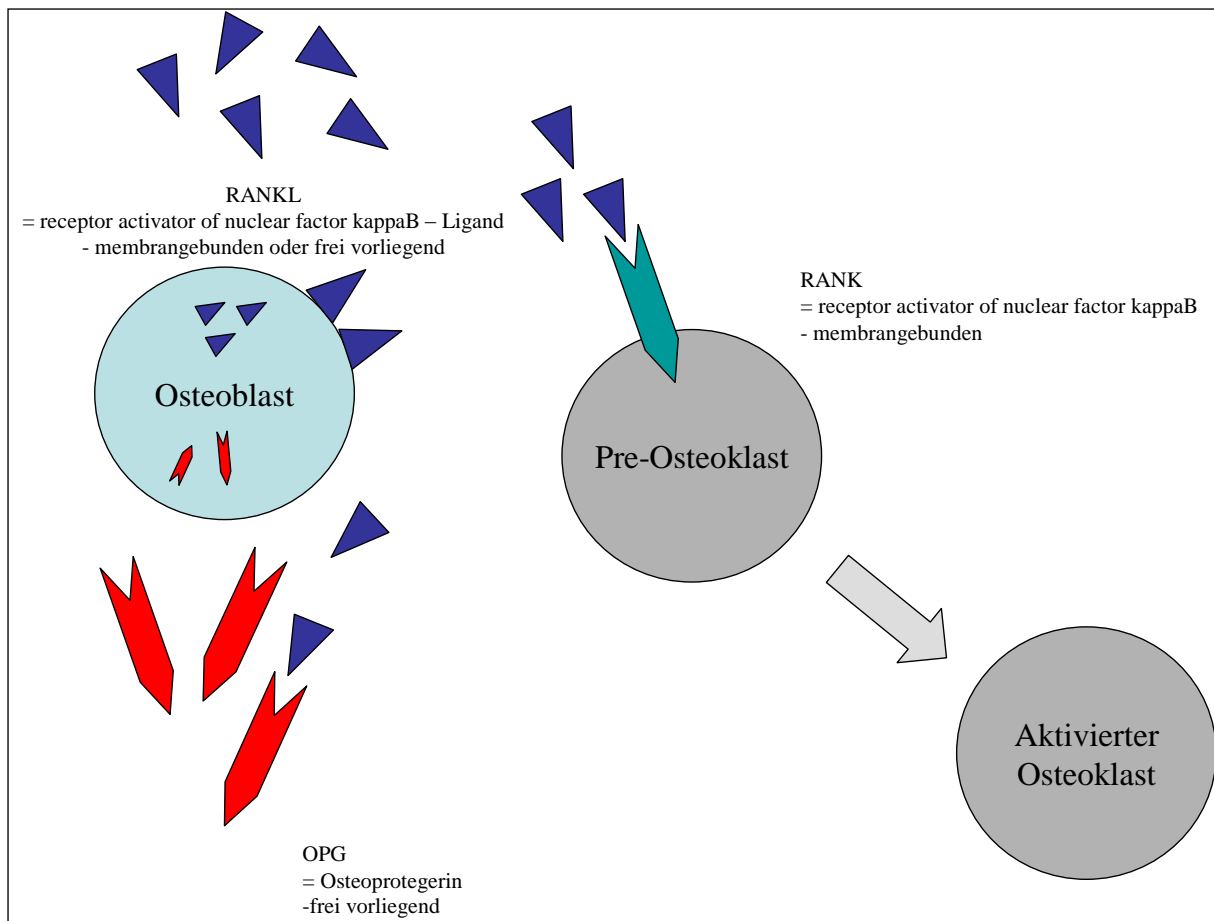
Zur Verständigung untereinander verwenden Osteoblasten und -klasten das RANK-RANKL-OPG-System. Dieses System reguliert die Osteoklastenformation und ist somit verantwortlich für das physiologische biochemische Gleichgewicht im Knochenstoffwechsel (Silva und Branco 2011).

RANKL steht für *receptor activator of nuclear factor kappaB-ligand* und OPG steht für *osteoprotegerin*; beide sind Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und gehören zur TNF-Rezeptor-Superfamilie. Sie werden von Osteoblasten gebildet. Der Osteoblast selbst stammt von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ab und hat die Aufgabe der Knochenbildung und der Regulation der Osteoklastenaktivität. Hierzu produziert er RANKL, ein Typ II-homotrimetisches Transmembranprotein, welches in drei Isoformen vorkommt: RANKL 1, RANKL 2 und RANKL 3. RANKL wird membrangebunden gebildet und bleibt entweder in dieser Form bestehen oder wird anschließend durch Metalloproteasen (MMP 3 oder 7) oder ADAM (eine Desintegrin- und Metallopeptidasendomäne) proteolytisch herausgeschnitten und sezerniert. RANKL bindet an RANK (*receptor activator of nuclear factor kappaB*,

ebenfalls Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie), ein Typ I-homotrimetrisches transmembranöses Protein, welches von Osteoklastenvorläuferzellen als membranständiger Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. Hierdurch wird die Osteoklastogenese angeregt und damit schließlich auch die Knochenresorption. Osteoklasten entstammen der myeloiden Zelllinie aus dem Knochenmark und gehören zur Gruppe der Makrophagen.

Gleichzeitig zur RANKL-Produktion bilden Osteoblasten selbst auch OPG, welches als natürlicher Antikörper (engl.: *decoy* = Lockvogel) gegen die RANKL-Wirkung fungiert. Damit hat der Osteoblast die Möglichkeit, die Stimulation der Osteoklasten selbst zu antagonisieren. OPG wird als lösliche Form sezerniert und bindet an RANKL, so dass dieses nicht mehr an RANK auf der Osteoklastenoberfläche binden kann (s. Abbildung 1-2). OPG kann durch verschiedene Mechanismen hoch- oder runterreguliert werden. Durch eine OPG-Erhöhung wird sekundär die Knochenresorption herab reguliert, durch eine OPG-Erniedrigung wird sekundär Knochenresorption ermöglicht. Studien haben gezeigt, dass auch Osteozyten einen regulatorischen Einfluss haben: Als Antwort auf mechanische Kräfte stimulieren sie die Osteoklastenaktivität sekundär, indem sie die RANKL-Produktion der Osteoblasten in ihrer direkten Umgebung hochregulieren. (Silva und Branco 2011; Raju et al. 2011)





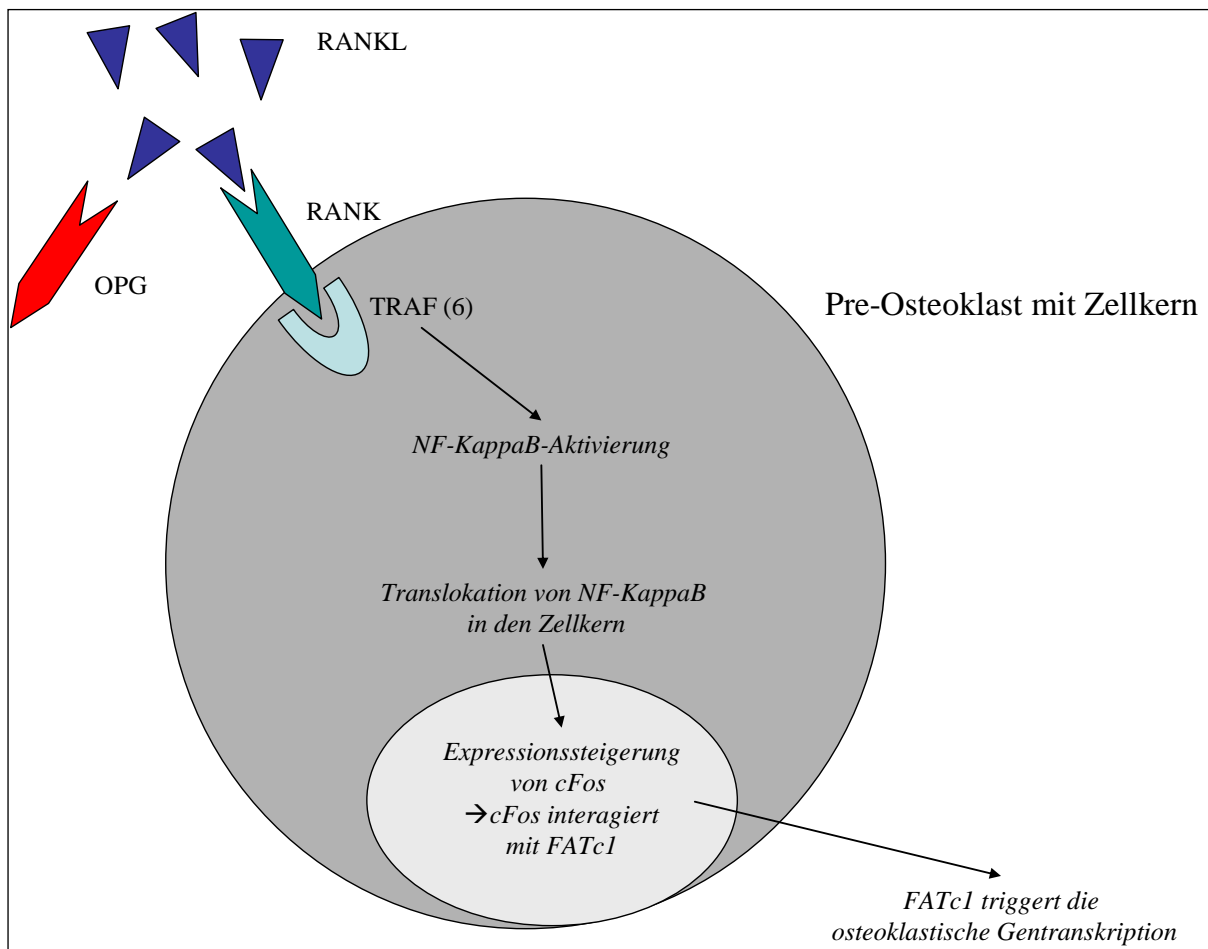
**Abbildung 1-2: Verständigungsmechanismus im Knochenstoffwechsel**

Diese Abbildung, modifiziert nach Silva und Branco (2011), zeigt schematisch den Verständigungsmechanismus zwischen den Osteoblasten und den Pre-Osteoklasten. Osteoblasten produzieren sowohl RANKL als auch OPG. RANKL kommt entweder frei oder membranegebunden auf der Osteoblastenoberfläche vor, OPG wird als freie Form sezerniert. RANKL kann an RANK binden, welches auf der Oberfläche des Pre-Osteoklasten exprimiert wird. Durch diesen Kommunikationsmechanismus wird der Pre-Osteoklast zum Osteoklasten aktiviert und Knochenabbau kann stattfinden. Das ebenfalls vom Osteoblasten sezernierte OPG fungiert als natürlicher Antikörper und kann RANKL binden, so dass es nicht mehr verfügbar für den Pre-Osteoklasten ist. Auf diese Weise kontrollieren die Osteoblasten die Aktivierung der Pre-Osteoklasten und steuern somit das Verhältnis von Knochenaufbau zu -abbau.

### 1.2.2 Biochemischer Ablauf der Interaktion im Detail

RANKL, von Osteoblasten gebildet und sezerniert, bindet an den nach extrazellulär gerichteten Teil von RANK auf den Pre-Osteoklasten. An RANKs zytoplasmatische Domäne gebunden ist der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierte-Faktor (TRAF). TRAF liegt als 2, 5 und 6 vor, wobei davon ausgegangen wird, dass im Knochenstoffwechsel nur TRAF 6 von Bedeutung ist, da nur der Ausfall von TRAF 6 zur Osteopetrose führt, also zu einem Ausfall an osteoklastischer Aktivität (Boyce und Xing 2007). Die Bindung von RANKL an RANK

führt zur *NF-κB*-Aktivierung und zur darauf folgenden Translokation von *NF-κB* in den Zellkern. Dort steigert NF-KappaB die Expression von c-Fos. Das c-Fos selbst wiederum interagiert mit FATc1, welches die osteoklastische Gentranskription insgesamt triggert. An dieser Stelle sei erwähnt, dass Studien an Mäusen ergeben haben, dass NFATc1 als Hauptregulator der Osteoklastenentwicklung fungiert. Biochemisch wird NFATc1 durch eine Kalzium-abhängige Calcineurin-Dephosphorylierung aktiviert (s. Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3: Biochemische Signaltransduktion im Detail**

Diese Abbildung, modifiziert nach Silva und Branco (2011), zeigt schematisch die Signaltransduktion, welche durch die Aktivierung von RANK durch RANKL ausgelöst wird.

Insgesamt aktiviert der zyttoplasmatische Teil des RANK-Rezeptors sieben verschiedene Signalkaskaden, die alle zu einer gesteigerten Osteoklastenentwicklung und -aktivierung sowie zu einem erhöhten Überleben der Osteoklasten führen (Silva und Branco 2011; Boyce und Xing 2008).

### 1.2.3 OPG-RANKL-Komplex

Das Verhältnis von OPG zu RANKL (OPG:RANKL-Ratio) spiegelt den Zustand des Knochenumbaus wider. Ein hohes Verhältnis, also relativ mehr OPG als RANKL, führt zu weniger Resorption, also relativ mehr Knochenaufbau, während ein niedriges Verhältnis, also relativ weniger OPG als RANKL, zu vermehrter Resorption, also Knochenabbau führt.

Hat sich erst einmal der OPG-RANKL-Komplex gebildet, kann dieser auf zwei Arten internalisiert und damit unwirksam gemacht werden: Zum einen durch sogenannte *lipid-rafts by membranous syndecan-1* und zum anderen durch den *clathrin-coat formation pathway*. Diese beiden Mechanismen entscheiden somit über die Bioverfügbarkeit des extrazellulären OPG.

Zusätzlich können Glykosaminoglykane (sog. GAGs, wie Heparin, Heparinsulfat oder Chondroitinsulfat) an der sog. Heparinbindungs-Domäne des OPG binden und somit praktisch um die RANKL-OPG-Interaktion konkurrieren, was OPG davor bewahrt, durch ein membrangebundenens RANKL internalisiert zu werden.

Die Komplexbildung von RANKL und OPG erklärt also die Verminderung der Knochenresorption (Silva und Branco 2011).

## 2 Ziel der Studie und Fragestellung

Das Ziel der Studie ist der Nachweis der Expression von RANK, RANKL und OPG im humanen Harnblasenkarzinom. RANK und RANKL-Ligand fungieren als physiologisches System im Knochenstoffwechsel, OPG ist ein natürlicher Antikörper von RANKL. Alle gemeinsam bedingen ein biochemisches Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Knochenmatrix. Nachgewiesen wurde das RANK-RANKL-OPG-System bereits in anderen Organen, wie zum Beispiel der Prostata oder der Brustdrüse. In Skelettmetastasen des Prostatakarzinoms wird es bereits für supportive Therapien genutzt. Somit kommt dem Nachweis im Harnblasenkarzinom ein besonderer Stellenwert zu.

Da das Harnblasenkarzinom mit einer Häufigkeit von etwa 30 % in das Skelettsystem metastasiert, wird in dieser Arbeit untersucht, ob eine pathologische Erhöhung von RANK, RANKL oder OPG im Urothelkarzinom vorliegt. Ebenfalls untersucht wird, ob eine pathologische Verschiebung des Gleichgewichts dieser Moleküle untereinander vorliegt, also eine relative Veränderung der Expressionen zueinander.

Anhand von histopathologischen Untersuchungen an Präparaten vom Urothelkarzinom der Harnblase des Menschen werden konkret folgende Fragestellungen untersucht:

- Ist ein histopathologischer (semi-)quantitativer Nachweis der Expression von RANK, RANKL oder OPG im Gewebe des Harnblasenkarzinoms (Urothel) möglich?
- Besteht ein Unterschied zwischen diesen Expressionen im Urothelkarzinom im Vergleich zum gesunden Urothel?
- Besteht eine Korrelation zwischen der Expression von RANK, RANKL oder OPG mit der Invasivität des Urothelkarzinoms (TNM-System)?
- Besteht eine Korrelation zwischen der Expression von RANK, RANKL oder OPG mit der Entdifferenzierung der Karzinome (Grading)?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von RANK, RANKL oder OPG mit der Metastasierung (M0/M1; N0/N1/N2)?
- Ist es sinnvoll, weiterführende Studien anzuschließen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Erstellung des Kollektivs und Beschreibung des allgemeinen Ablaufs

Patienten der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Göttingen, welche zwischen 2006 und 2012 eine radikale Zystektomie oder eine transurethrale Resektion der Harnblase erhielten, kamen in Frage, in die vorliegende Studie einbezogen zu werden. Anhand der Operationsdaten und vergebenen Pathologienummern wurden die Akten dieser Patienten angefordert und durchgesehen sowie klinische Daten erhoben. Es erfolgte eine Einschränkung dieser Vorauswahl auf ausschließlich Patienten mit einem Urothelkarzinom. Zusätzlich erfolgte vorab eine Selektionierung nach histopathologischer Brauchbarkeit der Schnittpräparate. Patienten mit nicht ausreichend Tumorgewebe in den Schnitten konnten so bereits ausgeschlossen werden. Die abschließende Auswahl fiel auf insgesamt 29 passende Patienten. Entsprechend des Ethikvotums wurde von den Patienten, welche zu diesem Zeitpunkt noch am Leben waren, eine schriftliche Einwilligung eingeholt. Bei bereits verstorbenen Patienten entfiel dieser Schritt gemäß dem Ethikvotum.

Als nächstes wurden von diesen Patienten alle vorhandenen histologischen Schnitte erneut mikroskopiert und der repräsentativste Schnitt ausgewählt. Es folgte die Suche nach den zugehörigen Parafinblöcken im Archiv der Pathologie. Anschließend erfolgte die Erstellung von neuen histopathologischen Schnitten und deren Anfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (s. Kap. 3.3 und 3.4). Abschließend wurde die Immunhistochemie durchgeführt (s. Kap. 3.5).

#### 3.2 Das Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden 40 Harnblasenbiopsien von 29 Patienten der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Göttingen untersucht. Das Ethikvotum der Medizinischen Fakultät hierfür liegt vor (Antragsnummer: 32/10/11).

Das Patientenkollektiv besteht aus 29 Patienten und setzt sich zusammen aus 23 Männern und sechs Frauen mit einem Geschlechterverhältnis von etwa 4:1. Das durchschnittliche Patientenalter zum Operationszeitpunkt (Datum der Biopsientnahme) liegt bei 67,2 Jahren. Es handelt sich histopathologisch ausschließlich um Urothelkarzinome (Transitionalzellkarzinome).

Die Tumoren wurden in der Primäruntersuchung durch den Pathologen entsprechend ihrer Differenzierung in G1-G3 unterteilt. In dieser Studie liegen insgesamt neun G1 (Grad 1)-, neun G2 (Grad 2)- und elf G3 (Grad 3)-Tumoren vor. Gemäß der TNM-Klassifikation wurde das Tumorstadium nach WHO beurteilt (s. Tabelle 7-1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms) und ergab eine Verteilung von 13 pTa-Tumoren, 0 pT1-Tumoren, fünf pT2-Tumoren, vier pT3-Tumoren und sieben pT4-Tumoren. Insgesamt lag bei elf Patienten eine gesicherte Metastasierung vor, davon bei sieben Patienten eine Lymphknotenmetastasierung (s. Tabelle 3-1: Das Patientenkollektiv).

<b>Patientenkollektiv</b>	<b>Absolute Anzahl</b>	<b>Relativer Anteil am Gesamtkollektiv (in Prozent)</b>
Anzahl Patienten	29	100 %
- davon weiblich	6	21 %
- davon männlich	23	79 %
Durchschnittsalter bei Probenentnahme	67,2 Jahre	-
Anzahl der Patienten gruppiert nach der TNM-Klassifikation		
- pTa	13	45 %
- pT1	0	0 %
- pT2	5	17 %
- pT3	4	14 %
- pT4	7	24 %
Anzahl der Patienten nach der Invasivität		
- nicht-invasiv	13	45 %
- invasiv	16	55 %

<b>Patientenkollektiv</b>	<b>Absolute Anzahl</b>	<b>Relativer Anteil am Gesamtkollektiv (in Prozent)</b>
Anzahl der Patienten nach Grad der Differenzierung – gesamt		
- G1	9	31 %
- G2	9	31 %
- G3	11	38 %
Anzahl der Patienten mit Metastasen		
- Gesamt	11	38 %
- M1	4	14 %
- N1-3	7	24 %

**Tabelle 3-1: Das Patientenkollektiv**

Diese Tabelle präsentiert das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie. Es ist aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Kriterien TNM-Stadium, Invasivität und Grading. Zusätzlich wird das Geschlechterverhältnis des Kollektivs gezeigt sowie das Durchschnittsalter bei Probenentnahme. Anhand dieser objektivierbaren Kriterien wurden Subgruppen erstellt, miteinander korreliert und anschließend statistisch ausgewertet.

Für die Präsentation der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden das gesamte Patientenkollektiv unterteilt, mehrere Kollektive anhand verschiedener Merkmale erstellt und anschließend miteinander korreliert:

Zum einen wurde das Kollektiv nach dem Wachstumsmuster der Karzinome (Staging) eingeteilt. Hierbei wurde gemäß der regulären TNM-Klassifikation vorgegangen; es erfolgten mehrere Vergleiche. Es wurden zunächst die Gruppen ‚pTa‘, ‚pT2‘, ‚pT3‘ und ‚pT4‘ gebildet und miteinander korreliert. Anschließend erfolgte eine übergeordnete Einteilung in die Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ und ‚invasive Karzinome‘ sowie die Gruppe ‚Metastasen‘. Die Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ entspricht der Gruppe ‚pTa‘, die Gruppe ‚invasive Karzinome‘ beinhaltet die Gruppe ‚pT2‘, ‚pT3‘ und ‚pT4‘. Gemäß dieser Einteilung erfolgte ebenfalls eine Korrelation zwischen den Gruppen.

Zum anderen erfolgte die Gruppierung aller Patienten zwecks Korrelation entsprechend ihres Gradings in G1 bis G3. Hierbei wurde bewusst auf die Infiltrationstiefe verzichtet, um eine

mögliche Abhängigkeit der Expressionen von dem histopathologischen Grading hervorzuheben.

### 3.3 Herstellung der Schnittpräparate

Initial, bei intraoperativer Entnahme des Gewebes, erfolgte zunächst die Fixierung der Gewebeproben in gepuffertem Formalinaldehyd (4 %). Die Entwässerung und endgültige Fixierung des Gewebes wurde anschließend vollautomatisch in einem Excelsior ES Gewebeprozessor (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Aus dem fixierten Gewebe wurde ein schneidbarer Block hergestellt, der nach Anschluß der Untersuchung licht- und staubgeschützt im Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen eingelagert wurde.

Aus den für diese Studie ausgewählten Tumorblöcken wurden neue Schnitte angefertigt. Mittels eines Schlittenmikrotoms HM 400 der Firma Thermo Scientific™ (Dreieich, Deutschland) wurden Parafinschnitte mit einer Schichtdicke von 2 µm hergestellt, welche sodann in einem Wasserbad WBR der Firma Weinkauf Medizin und Umwelttechnik (Forchheim, Deutschland) auf Menzel-Gläser Superfrost™ Plus Objektträger der Firma Thermo Scientific™ aufgezogen wurden. In einem Trockenschrank UM 400 der Firma Memmert (Schwabach, Deutschland) wurden die Schnittpräparate bei 60 °C für 20 Stunden getrocknet und anschließend zur weiteren Verarbeitung licht- und staubgeschützt aufbewahrt.

### 3.4 Färbung Hämatoxylin-Eosin

Die histologischen Schnittpräparate wurden mit Mayer Hämalaun und Eosin angefärbt. Dieses erfolgte vollautomatisch in einem Prisma Multistainer (Sakura Finetek, Staufen, Deutschland). Die Anfärbung mit Hämalaun dient der Darstellung des Zellkerns, die Anfärbung mit Eosin dient der Darstellung des Zytoplasmas.

### 3.5 Immunhistochemie

Die angewendeten Antikörper, ihre Verdünnungen und Inkubationszeiten sowie die zugehörige Vorbehandlung werden in der Tabelle 3-2 angegeben.

Durchgeführt werden die einzelnen Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur; Abweichungen sind gesondert angegeben. Zur Färbung der



Immunhistochemie wird ein Gerät der Firma Mozaic Zymed Laboratories Inc / Tecan (Crailsheim, Deutschland) verwendet.

	<b>RANK</b>	<b>RANKL</b>	<b>OPG</b>
<b>Firma</b>	Santa Cruz Biotechnology, inc (Santa Cruz, CA, USA)	Santa Cruz Biotechnology, inc (Santa Cruz, CA, USA)	Abcam® discover more (Cambridge, United Kingdom)
<b>Verdünnung</b>	1/40	1/1000	1/200
<b>Inkubationszeit</b>	30 min	30 min	2 h
<b>Vorbehandlung</b>	pH 9	pH 9	pH 7.4
<b>Quelle</b>	RANK (H-300) = polyklonaler IgG Antikörper vom Kaninchen	RANKL (N-19) = polyklonaler IgG Antikörper von der Ziege	OPG = polyklonaler IgG Antikörper vom Kaninchen
<b>Molekulares Gewicht des Antikörpers (vorhergesagt)</b>	66 kDa	35-40 kDa (membrangebunden) 20-30 kDa (löslich)	46 kDa

**Tabelle 3-2: Immunhistochemie der Antikörper**

In der obigen Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper dargestellt, mit ihrer jeweiligen Verdünnung, Inkubationszeit sowie Vorbehandlung. Es werden außerdem die Quelle und das molekulare Gewicht angegeben.

### 3.6 Auswertung der Immunhistochemie mittels Allred-Score

Um die immunhistochemischen Färbungen zu objektivieren und auszuwerten, wurde der Allred-Score verwendet. Dieser Score stammt ursprünglich aus der Bewertung der Expression vom Steroidhormon-Rezeptor im Mammakarzinom. Unter Verwendung dieses immunoreaktiven Allred-Scores erfolgte die semiquantitative Begutachtung der Färbeargebnisse für die Antikörper RANK, RANKL und OPG. Hierzu wurde ein Diagnostiklichtmikroskop BX41 der Firma Olympus (Hamburg, Deutschland) verwendet.

Der Allred-Score setzt sich zusammen aus der Summe von zwei einzelnen Punktwerten. Um die beiden einzelnen Punktwerte zu vergeben, wird das Tumorgewebe nach den folgenden erklärten Kriterien bewertet. Der eine Punktwert entspricht dem Anteil von positiven Zellsignalen an allen Zellen in Prozent (Proportionalität). Diesem Prozentwert wird ein

Punktwert von 0 bis 5 zugeordnet. Der andere Punktwert entspricht der Intensität der Färbung. Die Intensität kann zwischen nicht angefärbt (keine) und starker Intensität (stark) liegen, die entsprechenden Punktwerte liegen zwischen 0 und 3.

Aus Proportionalität und Intensität der Färbung wird die Summe gebildet, welche zwischen 0 und 8 liegt. In der Beurteilung der Hormonrezeptoren im Mammakarzinom wird dieser Punktwert zusätzlich dichotomisiert und eingeteilt in negativ (0-2) und positiv (3-8). Bei der Bewertung der Expression von RANK, RANKL und OPG in dieser Arbeit wurde davon Abstand genommen und mit dem absoluten Summenwert gearbeitet. (Daltoé et al. 2014; Rokita et al. 2013)

Der Allred-Score ist in der Tabelle 3-3 dargestellt.

<b>(Oberservierte) positive Zellen in Prozent</b>	<b>Proportionaler Wert (= Proportional Score, PS)</b>
0 %	0
1 %	1
2-10 %	2
11-33 %	3
34-66 %	4
67-100 %	5
<b>(Observierte) Färbungsintensität</b>	<b>Intensitätswert (= Intensity Score, IS)</b>
keine	0
schwach	1
mittel	2
stark	3
<b>Summe des Proportionalen Wertes und des Intensitätswertes; Färbungsgrad (= PS + IS)</b>	<b>Beurteilung der Summe, Dichotomisierung bei Anwendung auf das Mammakarzinom</b>
0-2	negativ
3-8	positiv

**Tabelle 3-3: Allred-Score zur Quantifizierung der Zellsignale**

Der Allred-Score dient der Quantifizierung der Zellsignale nach immunhistochemischer Anfärbung mit den Antikörpern RANK, RANKL und OPG. Es wird einerseits der Anteil der angefärbten Zellen an allen Zellen sowie andererseits die Farbintensität der Färbung berücksichtigt. Dementsprechend wird jeweils ein Punktwert vergeben und eine Summe daraus gebildet. Der Summenwert liegt zwischen 0 und 8.

### 3.7 Datenerfassung und statistische Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte mittels Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), die statistische Auswertung erfolgte mittels Statistik-Software Statistica 10.0 (StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg, Deutschland).

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Expressionen der Antikörper und den Infiltrationstiefen der Karzinome und deren Grading herauszuarbeiten und darzustellen, wurden für die Berechnung des p-Wertes der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test angewandt sowie für die graphische Darstellung der Ergebnisse Boxplots (Median und 25 %- und 75 %-Quantile) verwendet.

Das Signifikanzniveau der p-Werte für die Ergebnisse entspricht folgender Einteilung: Als nicht signifikant (= n. s.) gelten Werte größer gleich 0,05. Ergebnisse mit Werten zwischen <0,05 und 0,01 werden als signifikant (= \*) bezeichnet, zwischen <0,01 und 0,0001 als sehr signifikant (= \*\*). Als hoch signifikant (= \*\*\*) gelten Werte <0,0001.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Datenquelle und Stammblatt

Alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten werden im folgenden Datenstammblatt anonymisiert präsentiert. Es enthält eine Patientenummer (für diese Studie zum Zwecke der Anonymisierung neu vergeben), das Alter und Geschlecht des Patienten sowie die zugeordnete TNM-Klassifikation und das histologische Grading. Außerdem wird der Allred-Score für RANK und RANKL sowie für OPG aufgeführt. Da es sich ausschließlich um Karzinome vom Urotheltyp handelt, wird dieses nicht gesondert angegeben. Für die statistischen Auswertungen stellte das Datenstammblatt die Bezugsquelle dar (s. Tabelle 4-1). Für einen besseren Überblick sei als Alternative an dieser Stelle auf die Tabelle 3-1: Das Patientenkollektiv hingewiesen, welche im Abschnitt Material und Methoden zu finden ist (s. hierfür Kapitel 3.2).

Pat-nr.	Geschlecht	Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Gewebentnahme	T	N	M	Grading	Allred-Score für RANK	Allred-Score für RANKL	Allred-Score für OPG
1	m	86	pTa	N0	M0	G2	4	8	6
2	m	55	pTa	N0	M0	G2	7	7	7
3	m	70	pTa	N0	M0	G2	4	7	7
4	m	74	pTa	N0	M0	G1	6	7	7
5	w	61	pTa	N0	M0	G1	5	7	6
6	m	81	pTa	N0	M0	G1	3	7	5
7	w	72	pTa	N0	M0	G1	3	8	6
8	m	66	pTa	N0	M0	G2	5	8	7
9	m	65	pTa	N0	M0	G1	4	8	7
10	m	74	pTa	N0	M0	G1	3	8	6
11	m	58	pTa	N0	M0	G1	0	7	6
12	m	70	pTa	N0	M0	G1	3	7	4
13	m	45	pTa	N0	M0	G1	2	7	3
14	w	72	pT2	NX	MX	G2	3	6	4
15	w	61	pT2	NX	MX	G3	2	5	3
16	m	77	pT2	N1	MX	G3	5	5	6
17	m	82	pT3	NX	M1	G2	3	6	4
18	m	46	pT4	NX	M1	G2	0	4	7
19	w	54	pT4	NX	MX	G3	5	3	3
20	m	64	pT2	NX	MX	G3	3	2	3
21	m	84	pT2	NX	M1	G3	0	0	0

Pat-nr.	Geschlecht	Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme	T	N	M	Grading	Allred-Score für RANK	Allred-Score für RANKL	Allred-Score für OPG
22	m	83	pT4	N1	MX	G2	3	2	3
23	m	74	pT3	N0	MX	G2	0	2	0
24	m	57	pT4	N0	M1	G3	3	5	3
25	m	45	pT4	N2	MX	G3	0	0	0
26	w	70	pT4	N2	MX	G3	4	3	5
27	m	65	pT3	N2	MX	G3	5	4	0
28	m	79	pT3	N1	MX	G3	3	5	0
29	m	75	pT4	N2	M0	G3	3	5	7

**Tabelle 4-1: Datenstammbblatt**

Diese Tabelle gibt alle Patienten dieser Studie wieder und ist die Bezugsquelle für die statistischen Vergleiche und Auswertungen. Sie beinhaltet anonymisiert alle Patienten mit den zugehörigen klinischen Parametern und histopathologischen Ergebnissen der Studie.

## 4.2 Auswertung der immunhistochemischen Befunde

### 4.2.1 Mikroskopische Auswertung

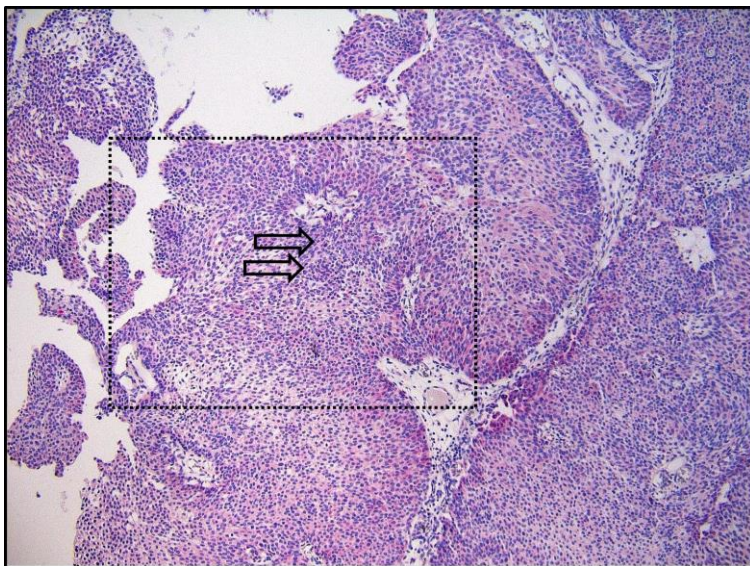
Die mikroskopische Auswertung der Immunhistochemie erfolgte semiquantitativ. Unter Zuhilfenahme des Allred-Scores konnte die Anfärbung für die Antikörper RANK, RANKL und OPG semiquantifiziert und einheitlich gestaltet werden. Repräsentative Abbildungen aller drei Färbungen werden hier in folgender Reihenfolge dargestellt: Zunächst wird das Expressionsmuster von RANK gezeigt, anschließend von RANKL und zuletzt von OPG.

## 4.2.2 Repräsentative Abbildungen aller drei Färbungen

In diesem Kapitel werden repräsentative Abbildungen aller drei Färbungen gezeigt. Es wird als erstes das Expressionsmuster von RANK gezeigt, anschließend von RANKL und zuletzt von OPG.

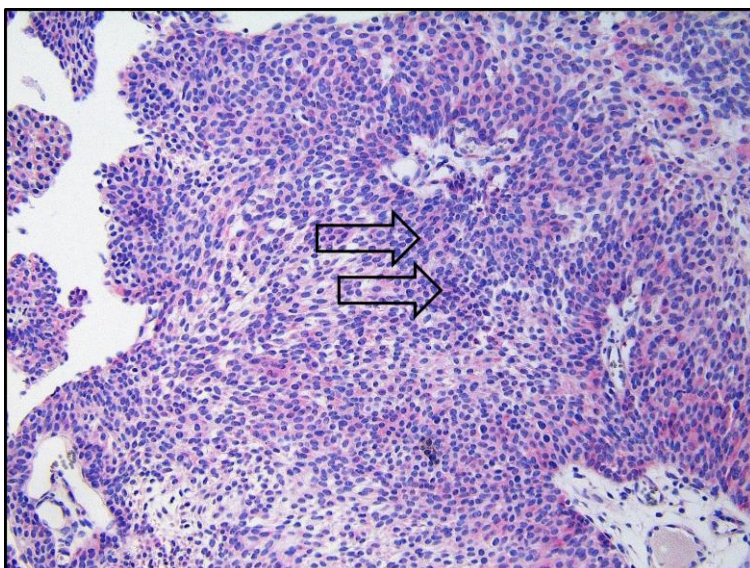
### 4.2.2.1 RANK

In diesem Kapitel sind die Anfärbungen von dem Antikörper RANK dargestellt. Die Abbildung 4-1 und die Abbildung 4-2 zeigen eine repräsentative Aufnahme in einem pTa-Tumor, angefärbt mit dem Antikörper RANK bei einer 100- und 200-fachen Vergrößerung.



**Abbildung 4-1: Antikörper RANK, pTa, Vergrößerung 100x**

Bei dieser Abbildung handelt es sich um einen pTa-Tumor mit 100-facher Vergrößerung. Angefärbt ist dieser Schnitt mit dem Antikörper RANK. Die Pfeile (→) zeigen auf Urothelzellen, welche die Färbung angenommen haben. Der Kasten zeigt den Ausschnitt, welcher in Abbildung 4-2 für die Vergrößerung gewählt wurde.

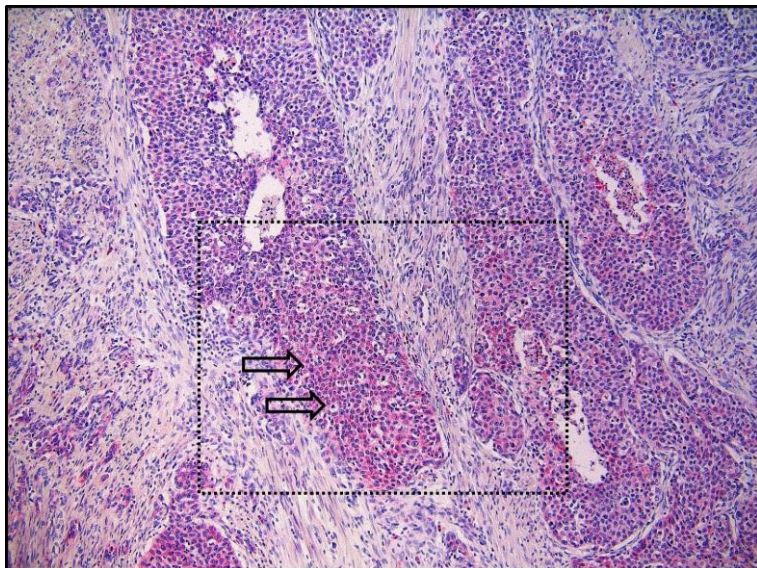


**Abbildung 4-2: Antikörper RANK, pTa, Vergrößerung 200x**

Diese Abbildung stellt eine Vergrößerung der Abbildung 4-1 dar. Ebenfalls zeigen die Pfeile (→) auf Urothelzellen, welche mit RANK angefärbt wurden.

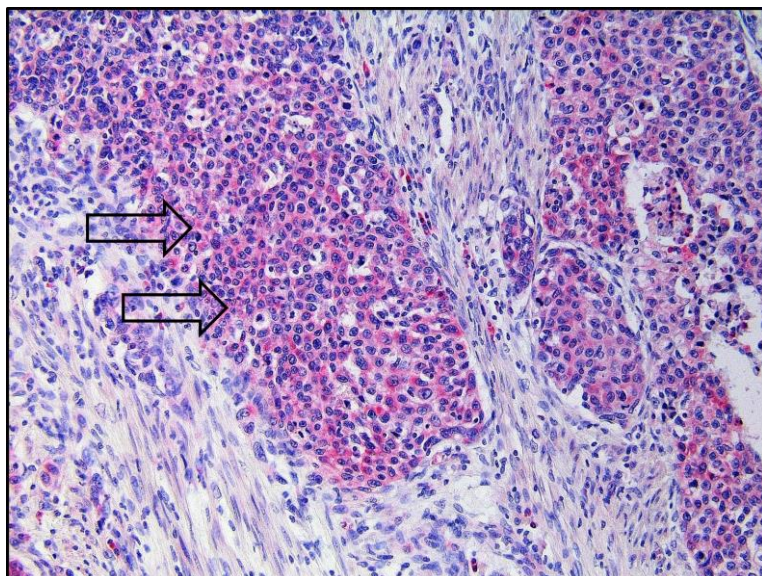


Als nächstes wird eine repräsentative Abbildung von der Anfärbung mit dem RANK-Antikörper in einem pT4-Tumor gezeigt, zuerst mit einer 100-fachen Vergrößerung (Abbildung 4-3) und anschließend mit einer 200-fachen Vergrößerung (Abbildung 4-4).



**Abbildung 4-3: Antikörper RANK, pT4, Vergrößerung 100x**

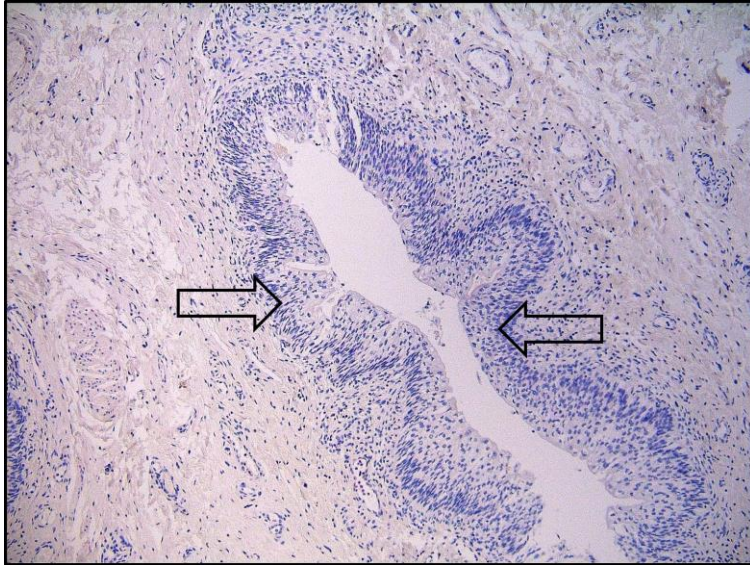
In dieser Abbildung ist ein pT4-Tumor dargestellt, mit der Anfärbung mit dem Antikörper RANK. Es handelt sich um eine 100-fache Vergrößerung. Die Pfeile (→) zeigen auf repräsentative Urothelkarzinomzellen, welche eine mittelgradige Expression aufweisen. Der Kasten zeigt den Ausschnitt der Vergrößerung der Abbildung 4-4.



**Abbildung 4-4: Antikörper RANK, pT4, Vergrößerung 200x**

Diese Abbildung ist ein Ausschnitt der Abbildung 4-3 in 200-facher Vergrößerung. Die Pfeile (→) zeigen ebenfalls auf Urothelkarzinomzellen mit mittelgradiger Expression.

Zuletzt ist in diesem Kapitel eine Abbildung von gesundem Urothel dargestellt, ebenfalls angefärbt mit dem Antikörper RANK. Es handelt sich um eine 100-fache Vergrößerung.

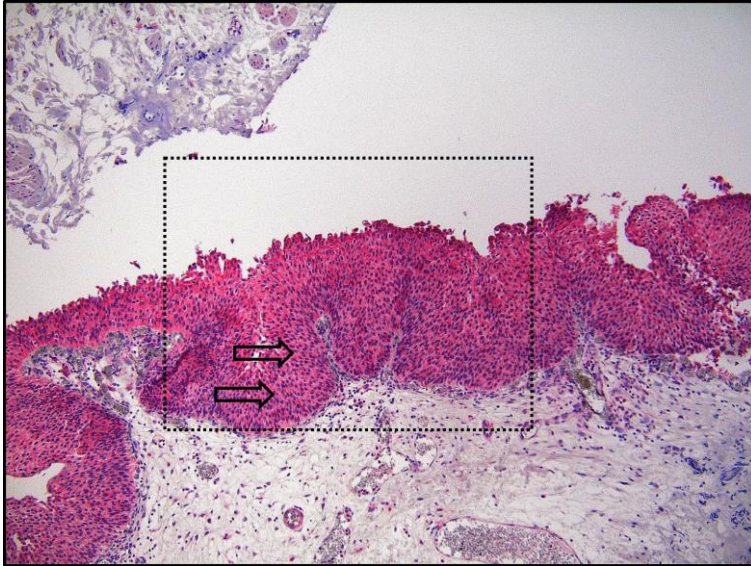


**Abbildung 4-5: Antikörper RANK, gesundes Urothel, Vergrößerung 100x**  
Diese Abbildung zeigt gesundes Urothel, welches keine maligne Entartung aufweist. Es handelt sich um eine 100-fache Vergrößerung. Es wird deutlich, dass sich keine Anfärbung zeigt und somit von keiner Expression von RANK ausgegangen wird. Die Pfeile (→) zeigen auf gesundes Urothel.



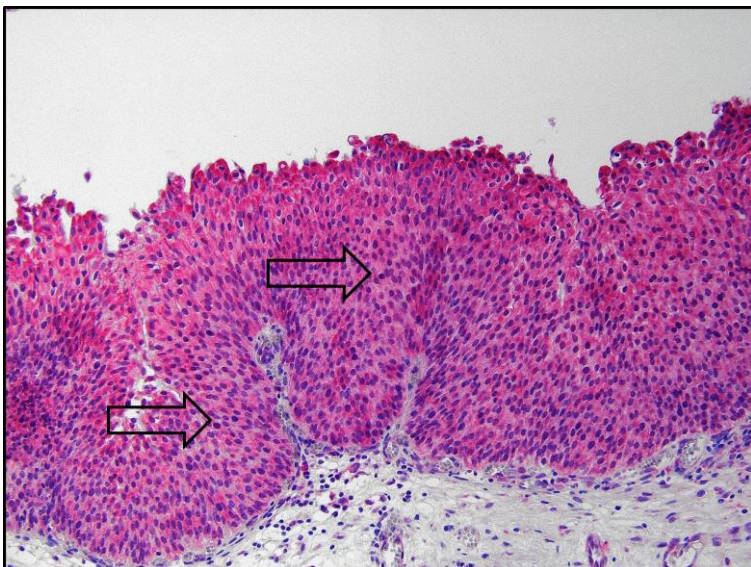
#### 4.2.2.2 RANKL

In diesem Kapitel werden die Anfärbungen mit RANKL in pTa-Tumoren, pT4-Tumoren und gesundem Urothel gezeigt. Hervorzuheben ist die deutliche Expression in wenig invasiven Tumoren (pTa), welche als erstes in der Abbildung 4-6 und Abbildung 4-7 zu sehen ist.



**Abbildung 4-6: Antikörper RANKL, pTa, Vergrößerung 100x**

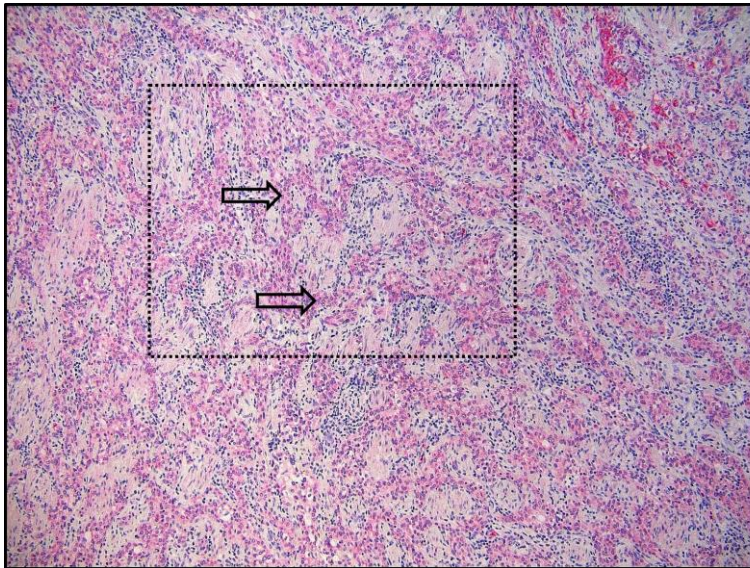
In dieser Abbildung ist ein pTa-Tumor mit RANKL gezeigt. Es handelt sich um eine 100-fache Vergrößerung. Es ist eine ausgeprägte Anfärbung durch den Antikörper RANKL zu sehen. Die Pfeile (→) zeigen auf Urothelzellen, welche eine starke Expression vorweisen. Der Kasten zeigt den Ausschnitt für die Vergrößerung der Abbildung 4-7.



**Abbildung 4-7: Antikörper RANKL, pTa, Vergrößerung 200x**

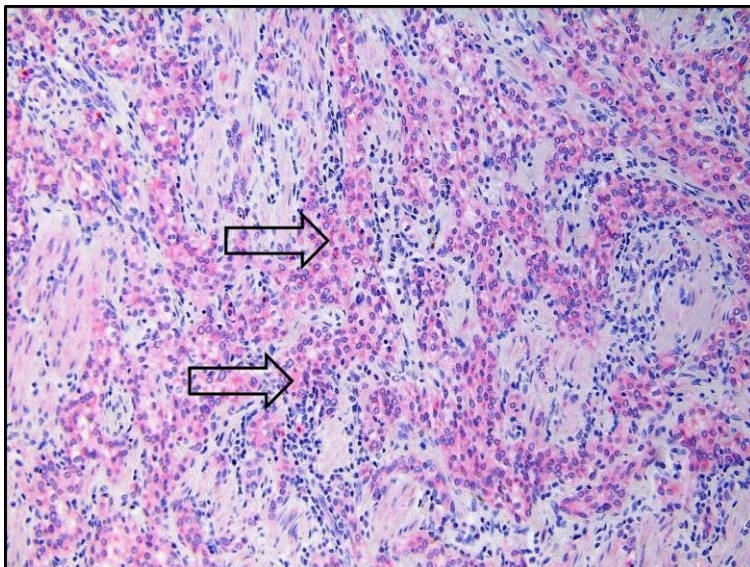
Diese Vergrößerung ist ein Ausschnitt aus der Abbildung 4-6. Es handelt sich also ebenfalls um einen pTa-Tumor, hier mit einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile (→) zeigen auf stark angefärbte Urothelzellen.

Als nächstes werden Abbildungen von pT4-Tumoren gezeigt, welche eine mittelgradige Expression von RANKL vorweisen.



**Abbildung 4-8: Antikörper RANKL, pT4, Vergrößerung 100x**

In dieser Abbildung ist ein pT4-Tumor zu sehen, welcher mit dem RANKL-Antikörper angefärbt ist. Die Vergrößerung ist 100-fach. Der Kasten zeigt den Ausschnitt, welcher in der Abbildung 4-9 gewählt ist. Die Pfeile zeigen auf repräsentative mittelgradig angefärbte Urothelkarzinomzellen.

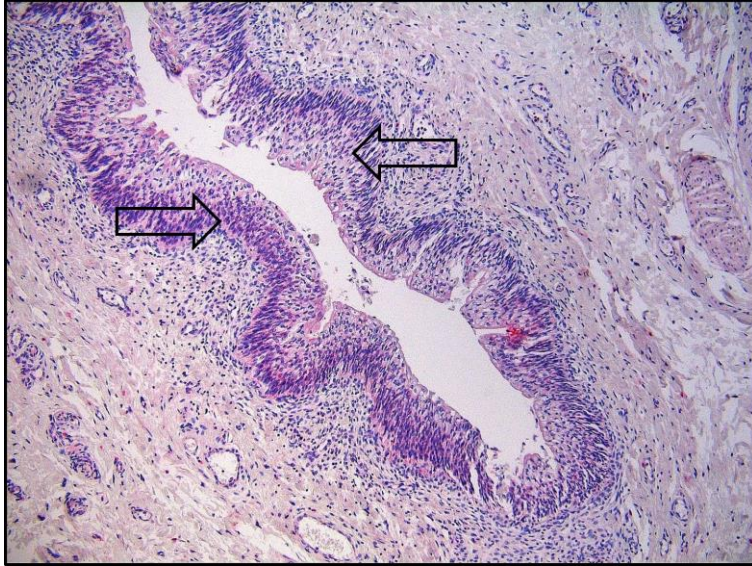


**Abbildung 4-9: Antikörper RANKL, pT4, Vergrößerung 200x**

In dieser Vergrößerung zeigt sich, wie in der Abbildung 4-8, ein pT4-Tumor, hier mit einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen ebenfalls auf durch den Antikörper RANKL angefärbte Urothelkarzinomzellen.



Als letztes ist an dieser Stelle eine Abbildung von gesundem Urothel zu sehen, welches keine Expression von RANKL zeigt.

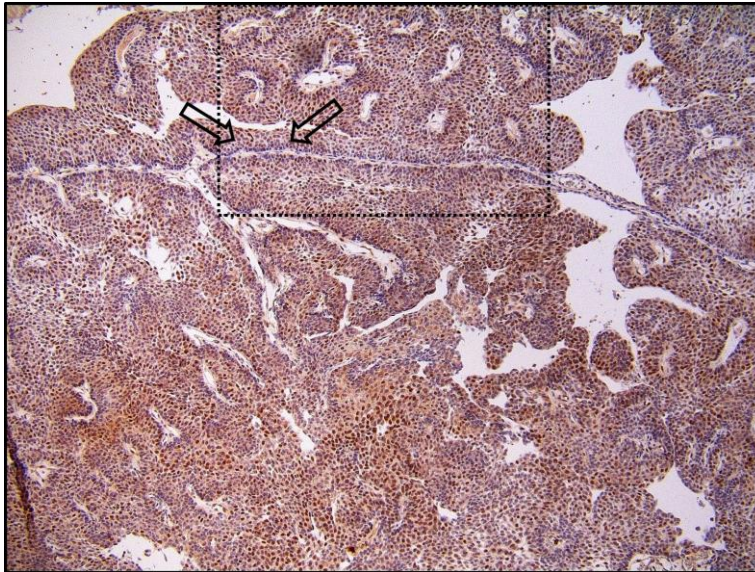


**Abbildung 4-10: Antikörper RANKL, gesundes Urothel, Vergrößerung 100x**

In dieser Abbildung ist gesundes Urothel zu sehen in einer 100-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen auf Urothelzellen, welche keine Anfärbung vorweisen.

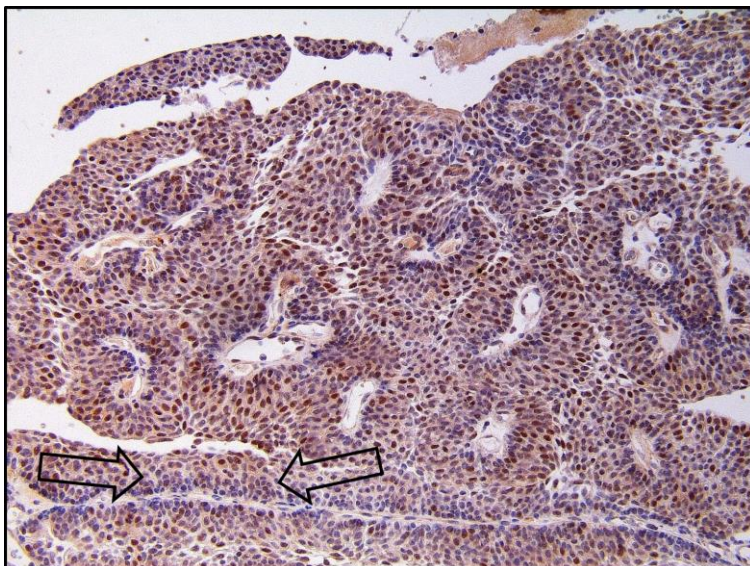
## 4.2.2.3 OPG

In diesem Kapitel werden pTa- und pT4-Tumoren sowie gesundes Urothel gezeigt, welche mit dem Antikörper OPG angefärbt wurden. Zuerst wird ein pTa-Tumor mit einer 100-fachen und 200-fachen Vergrößerung gezeigt und einer mittelstarken ausgeprägten Expression von OPG.



**Abbildung 4-11: Antikörper OPG, pTa, Vergrößerung 100x**

Diese Abbildung zeigt einen pTa-Tumor mit einer 100-fachen Vergrößerung. Es ist eine Anfärbung mit OPG erfolgt. Die Pfeile (→) zeigen auf repräsentative mittelgradig stark angefärbte Urothelkarzinomzellen, der Kasten zeigt den Ausschnitt der Vergrößerung für die Abbildung 4-12.

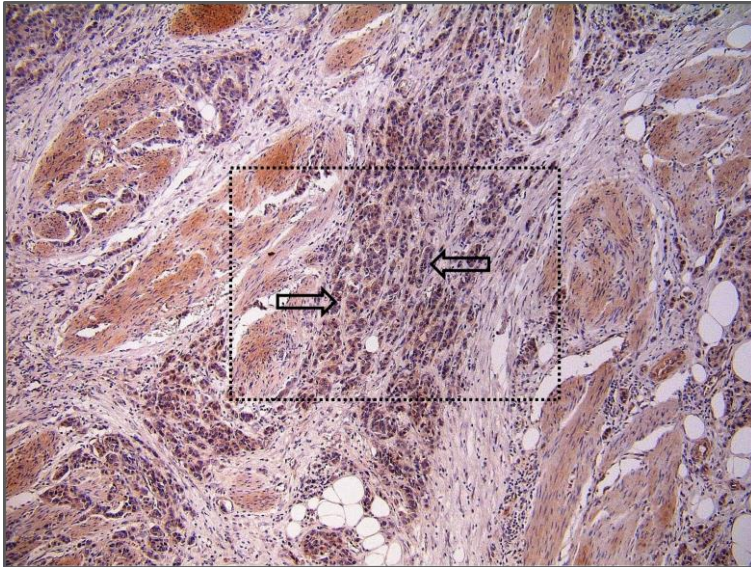


**Abbildung 4-12: Antikörper OPG, pTa, Vergrößerung 200x**

Diese Abbildung ist eine Vergrößerung der Abbildung 4-11, die Pfeile (→) zeigen auch hier auf Urothelkarzinomzellen mit mittelgradiger Anfärbung mit OPG. Es handelt sich um eine 200-fache Vergrößerung.

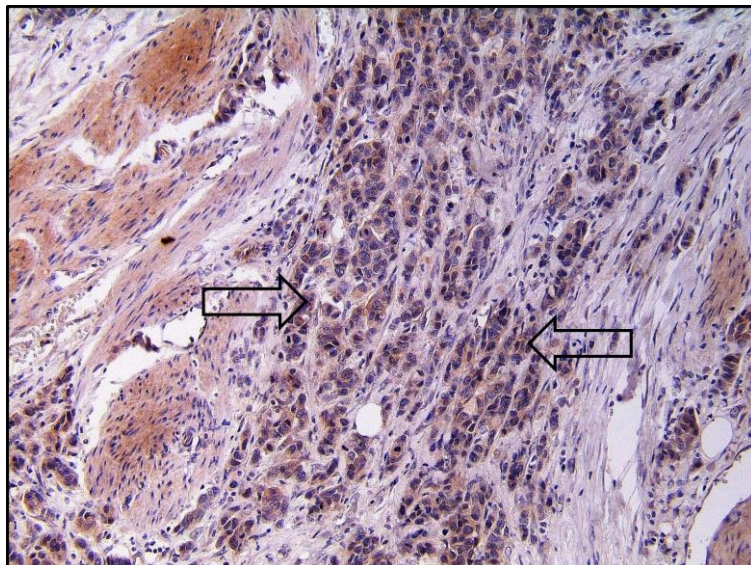


Als nächstes werden die pT4-Tumoren gezeigt, welche mit OPG angefärbt wurden. Es zeigt sich eine mittelgradige Anfärbung in beiden Vergrößerungen.



**Abbildung 4-13: Antikörper OPG, pT4, Vergrößerung 100x**

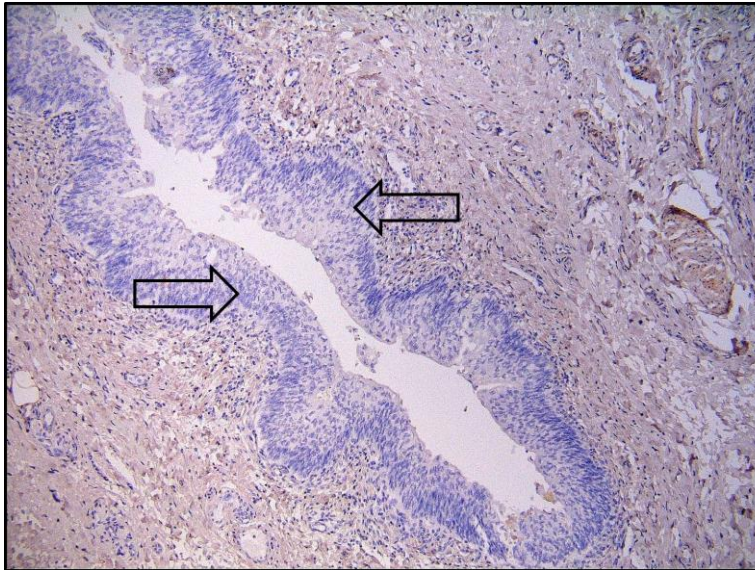
Diese Abbildung zeigt einen pT4-Tumor mit einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurde mit dem Antikörper OPG angefärbt. Der Kasten zeigt den Ausschnitt der Vergrößerung der Abbildung 4-14, die Pfeile (→) zeigen auf angefärbte Urothelkarzinomzellen.



**Abbildung 4-14: Antikörper OPG, pT4, Vergrößerung 200x**

Diese Vergrößerung ist ein Ausschnitt aus der Abbildung 4-13. Hier handelt es sich um eine 200-fache Vergrößerung. Die Pfeile (→) zeigen auf angefärbte Urothelkarzinomzellen.

Zuletzt ist eine Abbildung von gesundem Urothel zusehen, welches mit OPG angefärbt wurde. Es zeigt sich, dass keine Expression nachzuweisen ist.



**Abbildung 4-15: Antikörper OPG, gesundes Urothel, Vergrößerung 100x**

Die Abbildung zeigt gesundes Urothel in 100-facher Vergrößerung. Es erfolgte eine Behandlung mit OPG. Es zeigt sich, dass keine Expression nachweisbar ist.

Eine Übersicht über die Gesamtverteilung der unterschiedlichen Färbungsintensitätsgrade entsprechend des Allred-Scores für die RANK-, RANKL- und OPG-Expression ist in der Tabelle 4-2 abgebildet.

Allred-Score Färbungsgrad Summenwert	RANK <i>n</i>	Anteil am Gesamtkollektiv in Prozent	RANKL <i>n</i>	Anteil am Gesamtkollektiv in Prozent	OPG <i>n</i>	Anteil am Gesamtkollektiv in Prozent
0	5	17 %	2	7 %	5	17 %
1	0	0 %	0	0 %	0	0 %
2	2	7 %	3	10 %	0	0 %
3	11	38 %	2	7 %	6	21 %
4	4	14 %	2	7 %	3	10 %
5	5	17 %	5	17 %	2	7 %
6	1	3.5 %	2	7 %	6	21 %
7	1	3.5 %	8	28 %	7	24 %
8	0	0 %	5	17 %	0	0 %
Gesamt	29	100 %	29	100 %	29	100 %

**Tabelle 4-2: Verteilung der unterschiedlichen Färbungsintensitätsgrade nach dem Allred-Score im Gesamtkollektiv für RANK, RANKL und OPG**

Diese Tabelle zeigt die Verteilung der verschiedenen Antikörper am Gesamtkollektiv. In dieser Übersicht stellt sich gut dar, dass RANK sich vermehrt im Bereich von 3-5 des Allred-Score exprimiert, während RANKL insgesamt mit 5-8 eine stärkere Expression aufweist. OPG nimmt in dieser Verteilung einen intermediären Stellenwert ein.

### 4.3 Statistische Korrelationen der Expressionen

Die Expression von RANK, RANKL und OPG im Harnblasenkarzinom wurde mit unterschiedlichen pathologischen Parametern korreliert. Hierzu gehören das TNM-System und das histopathologische Grading.

#### Korrelation mit der TNM-Klassifikation und der Invasivität

Die Korrelation mit dem TNM-System erfolgte einerseits detailliert entsprechend der vom Pathologen vergebenen Invasionstiefe pTa, pT2, pT3, pT4, andererseits entsprechend einer übergeordneten Einteilung in invasive und nicht-invasive Karzinome. Hier entsprechen pTa-Karzinome der Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ und pT2, pT3 und pT4 zusammengefasst der Gruppe ‚invasive Karzinome‘. Zusätzlich erfolgte die Korrelation beider Gruppen (also ‚invasive Karzinome‘ und ‚nicht-invasive Karzinome‘) jeweils mit der Gruppe ‚Metastasen‘. Hier werden sowohl Lymphknoten- als auch Fernmetastasen in einer Gruppe zusammengefasst.

#### Korrelation mit dem histopathologischen Grading

Die Korrelation der einzelnen Ergebnisse mit dem Grading erfolgt entsprechend der Einteilung in G1, G2 und G3. Hier wird bewusst invasivitätsübergreifend – also unabhängig vom TNM-System – beurteilt, um so mögliche Auffälligkeiten entsprechend der Entdifferenzierung der einzelnen Zelle zu detektieren. Es werden nur Primärtumoren miteinander korreliert, die Ergebnisse von den Metastasen sind hier nicht enthalten.

Die Ergebnisse werden zusammengehörig dieserart präsentiert: Zunächst wird die Darstellung von RANK gezeigt, anschließend von RANKL und zuletzt von OPG. Es wird jeweils mit der Präsentation der Korrelationen innerhalb des TNM-Systems begonnen, die Korrelation mit der Invasionstiefe sowie mit dem Grading schließen sich an. Der jeweiligen graphischen Darstellung der Ergebnisse folgen eine Beschreibung und eine Auswertung dieser Ergebnisse. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse werden Boxplots verwendet; einem Boxplot ist jeweils eine Tabelle mit den aufgeschlüsselten Ergebnissen als Zahlenwerte zugehörig.

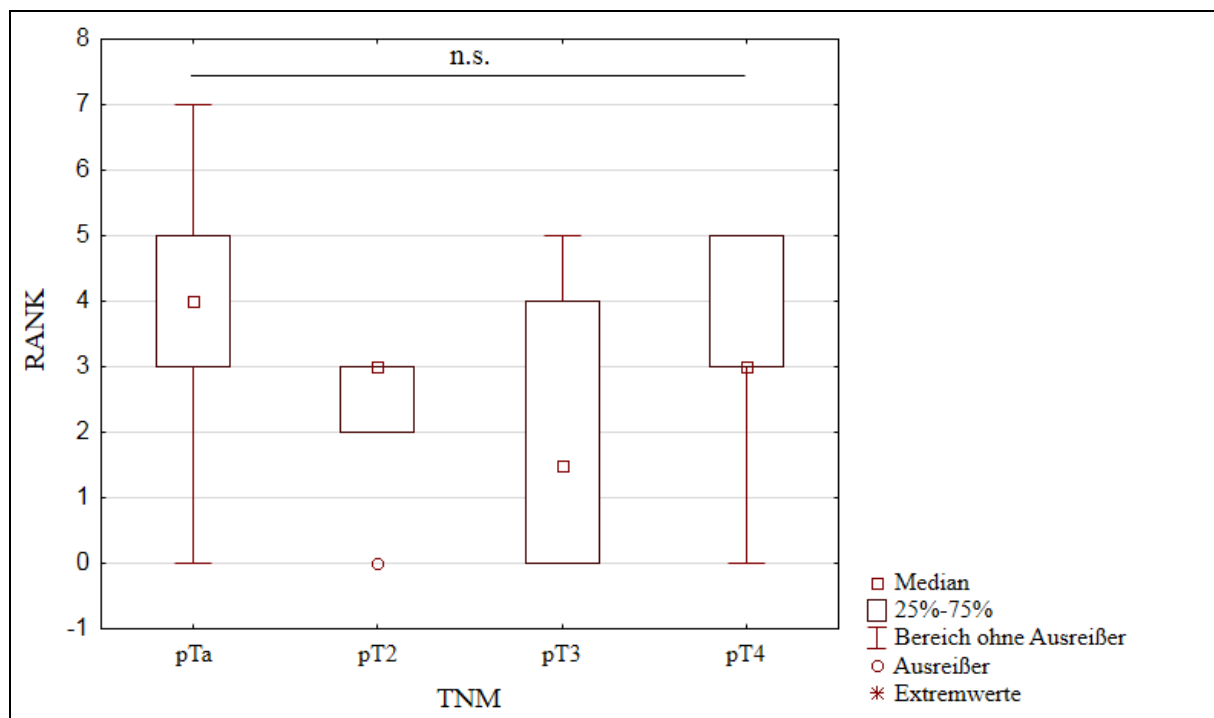


## 4.4 Präsentation der Ergebnisse

In diesem Kapitel erfolgt die graphische Darstellung und Beschreibung der Expressionsmuster von RANK, RANKL und OPG. Es zeigen sich unterschiedliche statistische Signifikanzen hinsichtlich der TNM-Klassifikation, der Stagings und des Gradings.

### 4.4.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von RANK

Als erstes wird das Expressionsmuster von RANK korreliert mit der TNM-Klassifikation, mit dem Grading und mit dem Staging. Es zeigen sich keine Korrelationen hinsichtlich der untersuchten Parameter.



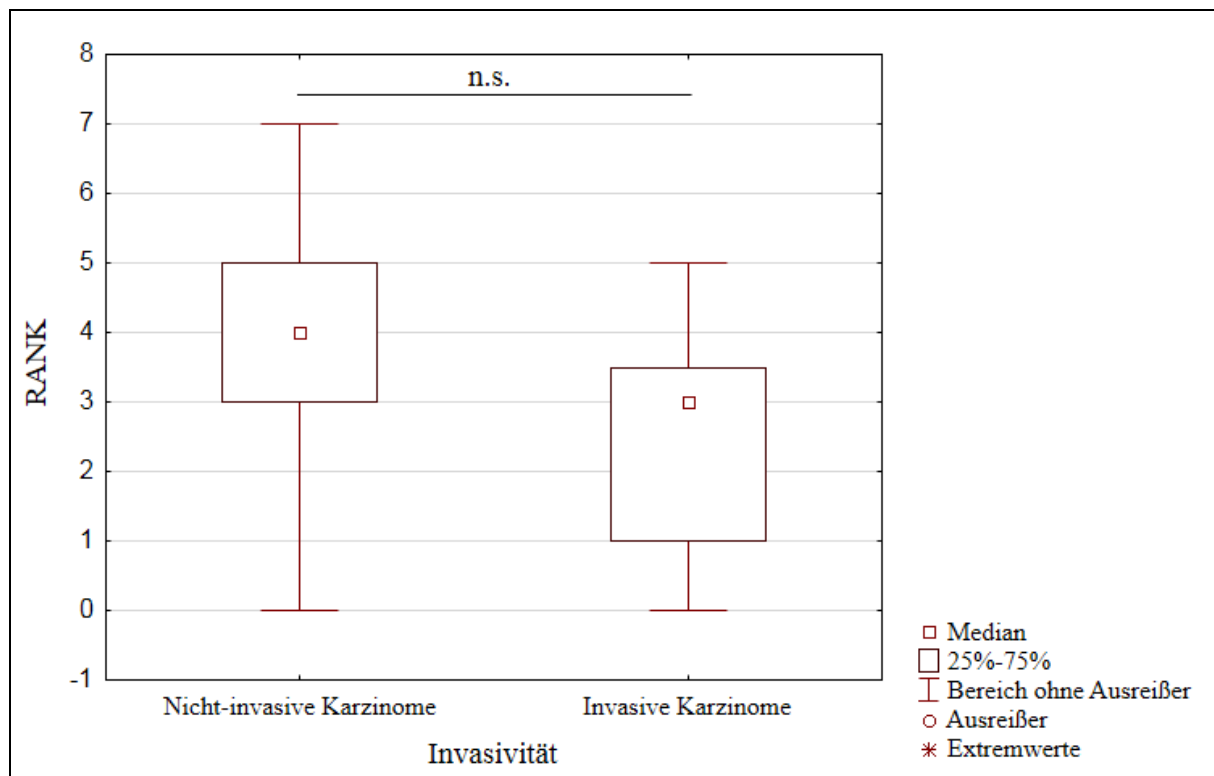
**Abbildung 4-16: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach TNM**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANK gezeigt (Ordinate), korreliert mit der TNM-Klassifikation (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereichs ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

TNM-System	Median der Expression von RANK	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
pTa	4	3	5	13	0,1535
pT2	3	2	3	5	
pT3	1.5	0	3.5	4	
pT4	3	3	4.5	7	

**Tabelle 4-3: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der TNM-Klassifikation**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score, \*berechnet mittels Kruskal-Wallis-Test



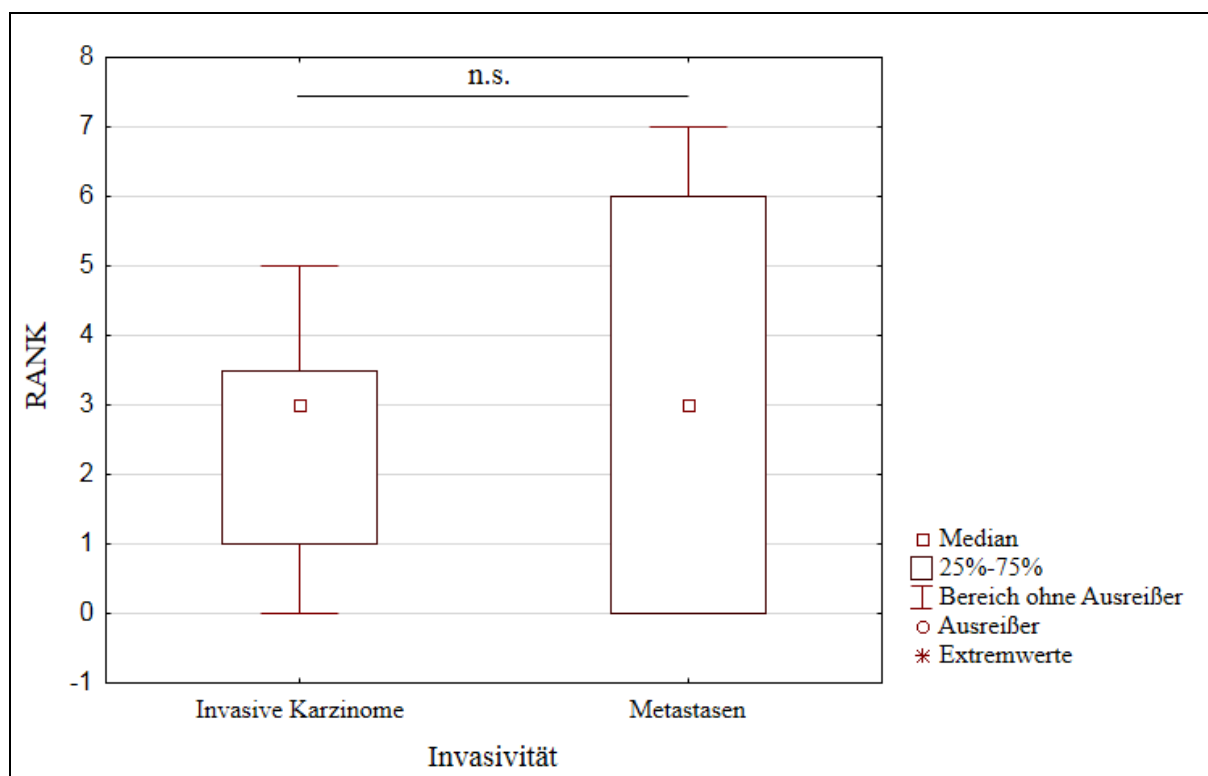
**Abbildung 4-17: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Invasivität (1)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANK gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von RANK	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Nicht-invasive Karzinome	4	3	5	13	0,130300
Invasive Karzinome	3	1.5	3.25	16	

**Tabelle 4-4: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der Invasivität (1)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



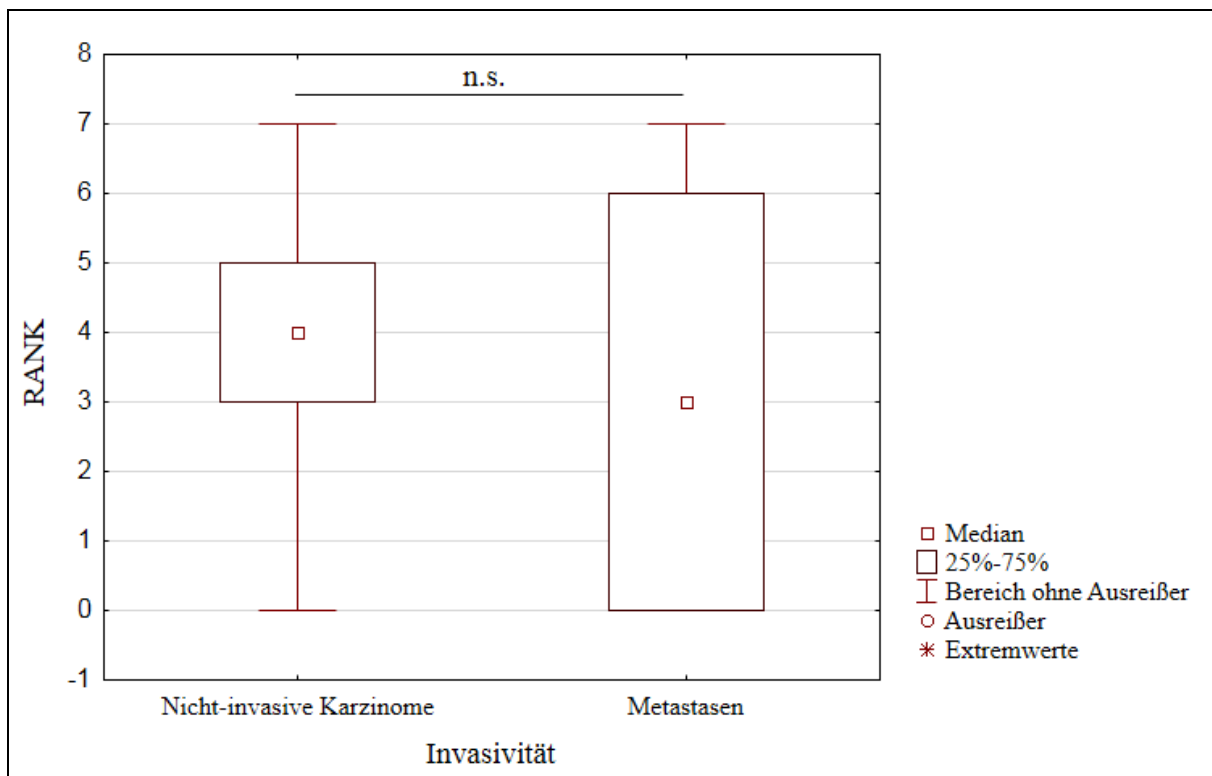
**Abbildung 4-18: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Invasivität (2)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANK gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von RANK	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Invasive Karzinome	3	1.5	3.25	16	0,72977
Metastasen	3	0	5.5	11	

**Tabelle 4-5: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der Invasivität (2);**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



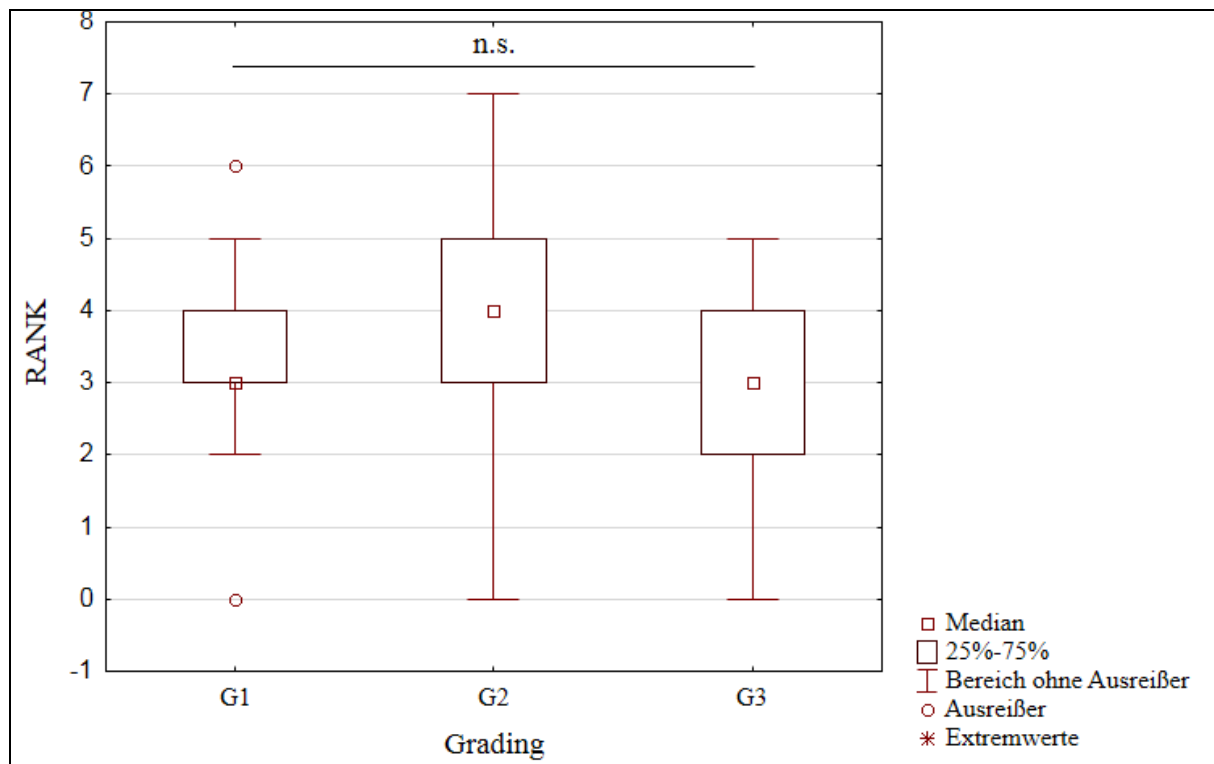
**Abbildung 4-19: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Invasivität (3)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANK gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von RANK	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Nicht-invasive Karzinome	4	3	5	13	0,602068
Metastasen	3	0	5.5	11	

**Tabelle 4-6: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der Invasivität (3)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



**Abbildung 4-20: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Grading (G1, G2, G3)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANK gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Grading (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Grading	Median der Expression von RANK	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
G1	3	3	4	9	0,5013
G2	4	3	5	9	
G3	3	2.5	3.5	11	

**Tabelle 4-7: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit dem Grading**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Kruskal-Wallis-Test

#### 4.4.2 Beschreibung der Ergebnisse der Expression von RANK

##### Wachstumsmuster – TNM-System

Gemäß der Einteilung des Gesamtkollektivs nach dem TNM-System entspricht der Median der Expression von RANK in der Gruppe ‚pTa‘ 4, die mittleren 50 % dieser Gruppe liegen zwischen 3 und 5. Der Maximalwert dieser Gruppe liegt bei 7, der Minimalwert bei 0.

Die Gruppe ‚pT2‘ zeigt einen Median von 3, wobei die mittleren 50 % der Werte bei 2 und 3 liegen. Außerdem liegt hier ein Maximalwert von 3 vor sowie ein Minimalwert von 0.

Der Median der Gruppe ‚pT3‘ liegt bei 1.5, die Werte bewegen sich verteilt zwischen 0 und 5, die mittleren 50 % der Werte liegen zwischen 0 und 4.

Bei der Gruppe ‚pT4‘ bildet sich ein Median von 3, wobei sich die mittleren 50 % zwischen 3 und 5 verteilen. Hier zeigen sich ein Maximalwert von 5 und ein Minimalwert von ebenfalls 0.

##### Wachstumsmuster – Invasivität

Aufgeschlüsselt nach der Invasivität entspricht die Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ der Gruppe ‚pTa‘ (s. o.).

Die Gruppe ‚invasive Karzinome‘ beinhaltet die einzelnen Gruppen ‚pT2‘, ‚pT3‘ und ‚pT4‘. Sie zeigt bei der Expression von RANK insgesamt einen Median von 3, einen Maximalwert von 5 und einen Minimalwert von 0. Die mittleren 50 % dieser Gruppe bewegen sich zwischen Werten von 1 bis 3.5. Die Gruppe ‚Metastasen‘ hat einen Median von 3, die mittleren 50 % der Werte verteilen sich zwischen 0 und 6. Es liegen hier ein Maximalwert von 7 und ein Minimalwert von 0 vor.

##### Grading

Differenziert man die Ergebnisse nach dem Grading, so zeigt sich für die Gruppe G1 ein Median von 3 bei einem Maximalwert von 6 (Ausreißer) und Minimalwert von 0 (ebenfalls Ausreißer). Die mittleren 50 % liegen zwischen 3 und 4.

Für die Gruppe G2 zeigt sich ein Median von 4, bei eine Verteilung der mittleren 50 % zwischen 3 und 5. Der Maximalwert dieser Gruppe liegt bei 7, der Minimalwert bei 0.

Der Median der Gruppe G3 liegt bei 3 mit einer Verteilung der mittleren 50 % zwischen 2 und 4. Hier gibt es Maximalwerte von 5 und Minimalwerte von 0.

##### Statistische Signifikanzen der Ergebnisse für RANK

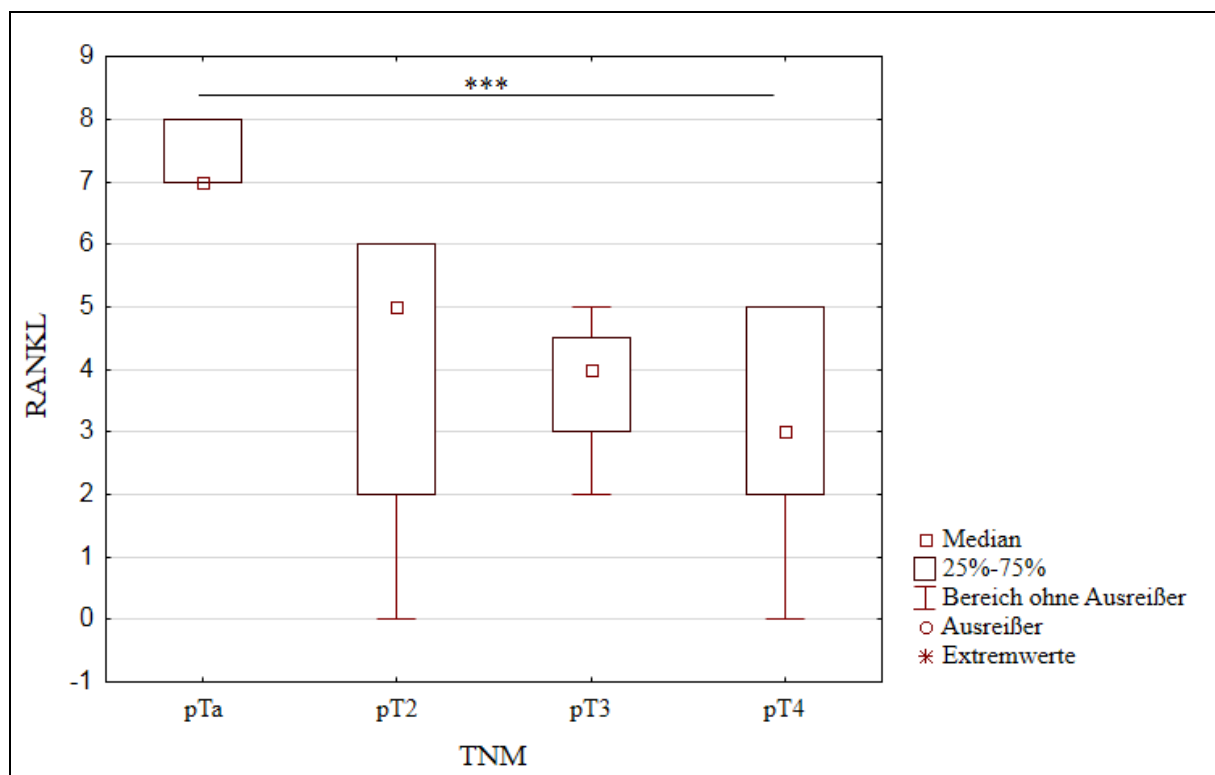
Es ist den Tabellen, graphischen Darstellungen und Beschreibungen der Ergebnisse zu entnehmen, dass sich bei der Expression von RANK keine elementaren Unterschiede zwischen einzelnen TNM-Untergruppen oder entsprechend des Gradings zeigen, es liegen

keine statistischen Signifikanzen vor. Es kann dementsprechend keine Korrelation bei der Expression von RANK nachgewiesen werden, weder abhängig vom TNM-System ( $p=0,1535$ ; s. Abbildung 4-16 und Tabelle 4-3) noch abhängig von der Invasivität im Vergleich zwischen nicht-invasiven Karzinomen zu invasiven Karzinomen ( $p=0,130300$ ; s. Abbildung 4-17 und Tabelle 4-4). Auch zeigt sich keine Signifikanz bei der Korrelation von invasiven Karzinomen zu Metastasen ( $p=0,729775$ ; s. Abbildung 4-18 und Tabelle 4-5) oder bei der Korrelation von nicht-invasiven Karzinomen zu Metastasen ( $p=0,602068$ ; s. Abbildung 4-19 und Tabelle 4-6). Ebenfalls nicht signifikant ist die Korrelation von dem Status des Gradings ( $p=0,5013$ ; s. Abbildung 4-20 und Tabelle 4-7).



#### 4.4.3 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von RANKL

Hier werden die Expressionsmuster von RANKL dargestellt. Es erfolgt eine Korrelation mit der TNM-Klassifikation, mit der Invasivität und mit dem Grading. Bei der Beschau der Korrelation mit allen aufgeführten Parametern zeigt sich eine deutliche inverse Beziehung – das heisst, je besser differenziert und je weniger invasiv das Karzinom gewachsen ist, desto stärker ist eine Expression von RANKL nachweisbar.



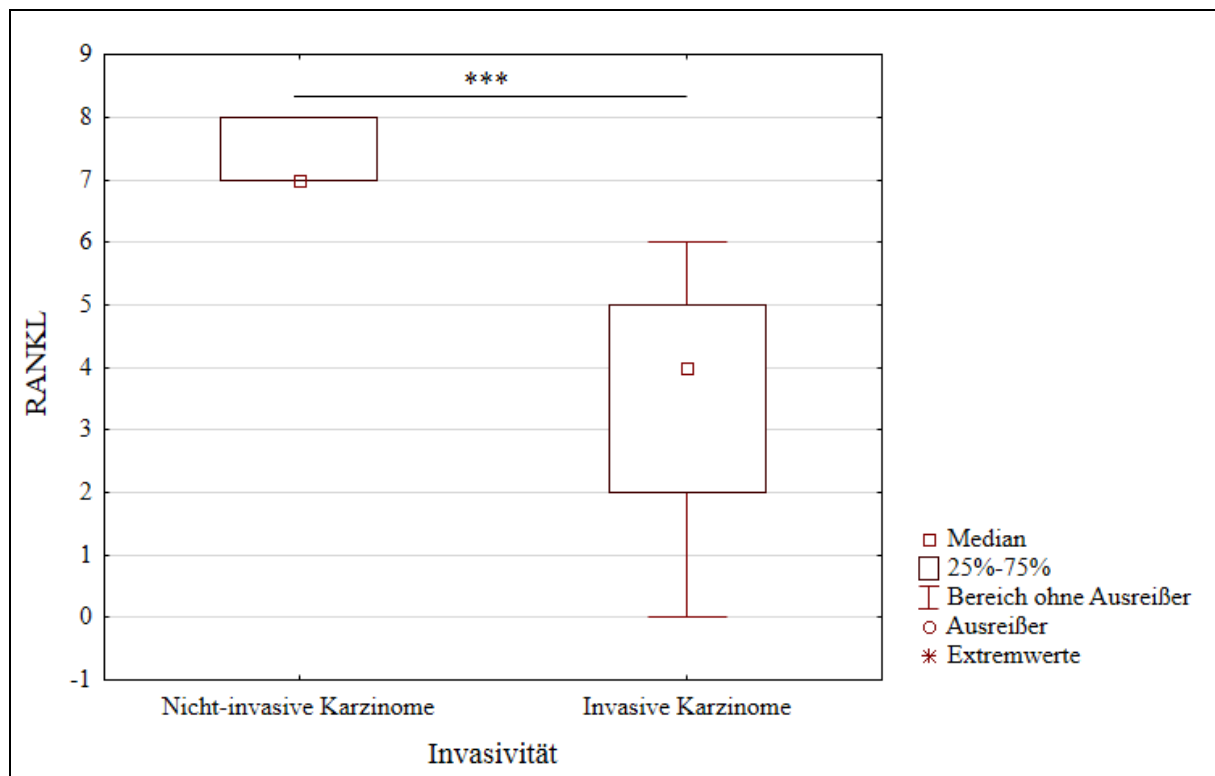
**Abbildung 4-21: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach TNM**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANKL gezeigt (Ordinate), korreliert mit der TNM-Klassifikation (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

TNM-System	Median der Expression von RANKL	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
pTa	7	7	8	13	0,00001
pT2	5	2	6	5	
pT3	4	3.5	4.25	4	
pT4	3	2.5	5	7	

**Tabelle 4-8: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der TNM-Klassifikation**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Kruskal-Wallis-Test



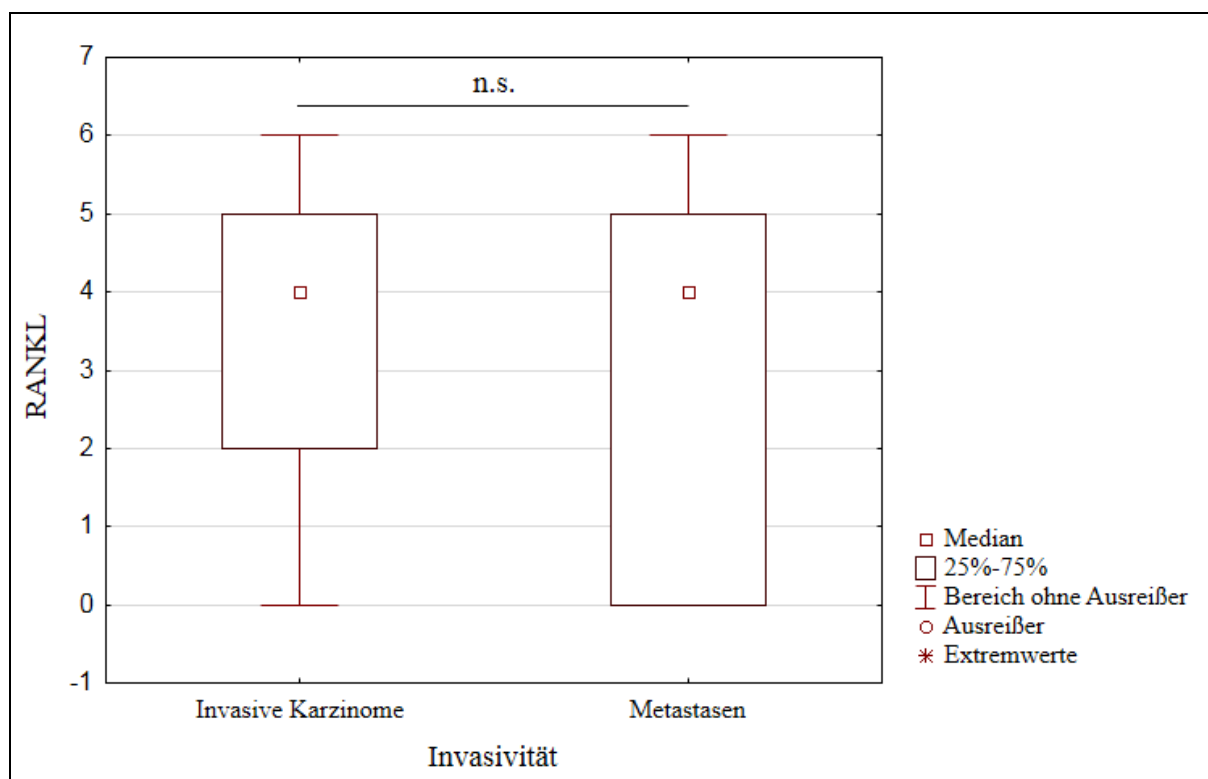
**Abbildung 4-22: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Invasivität (1)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANKL gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von RANKL	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Nicht-invasive Karzinome	7	7	8	13	0,000006
Invasive Karzinome	4	2	5	16	

**Tabelle 4-9: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der Invasivität (1)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



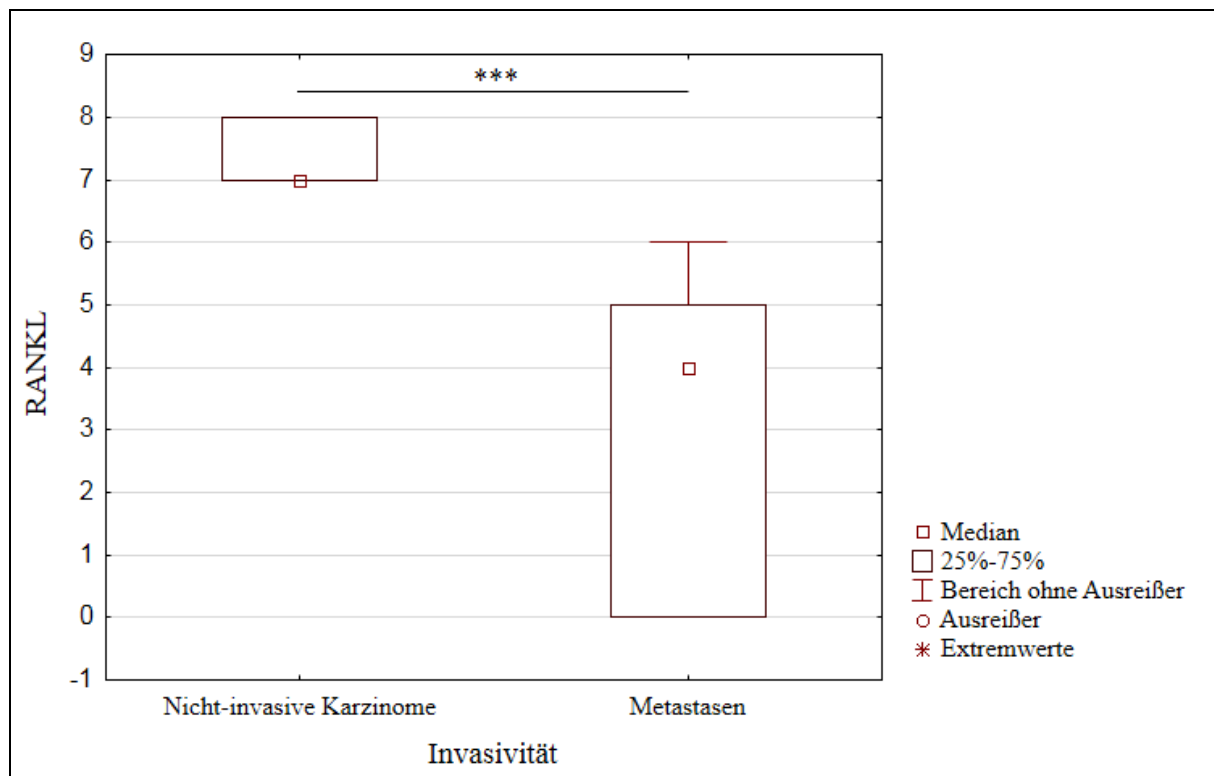
**Abbildung 4-23: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Invasivität (2)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANKL gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von RANKL	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Invasive Karzinome	4	2	5	16	0,748399
Metastasen	4	2	4.5	11	

**Tabelle 4-10: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der Invasivität (2)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



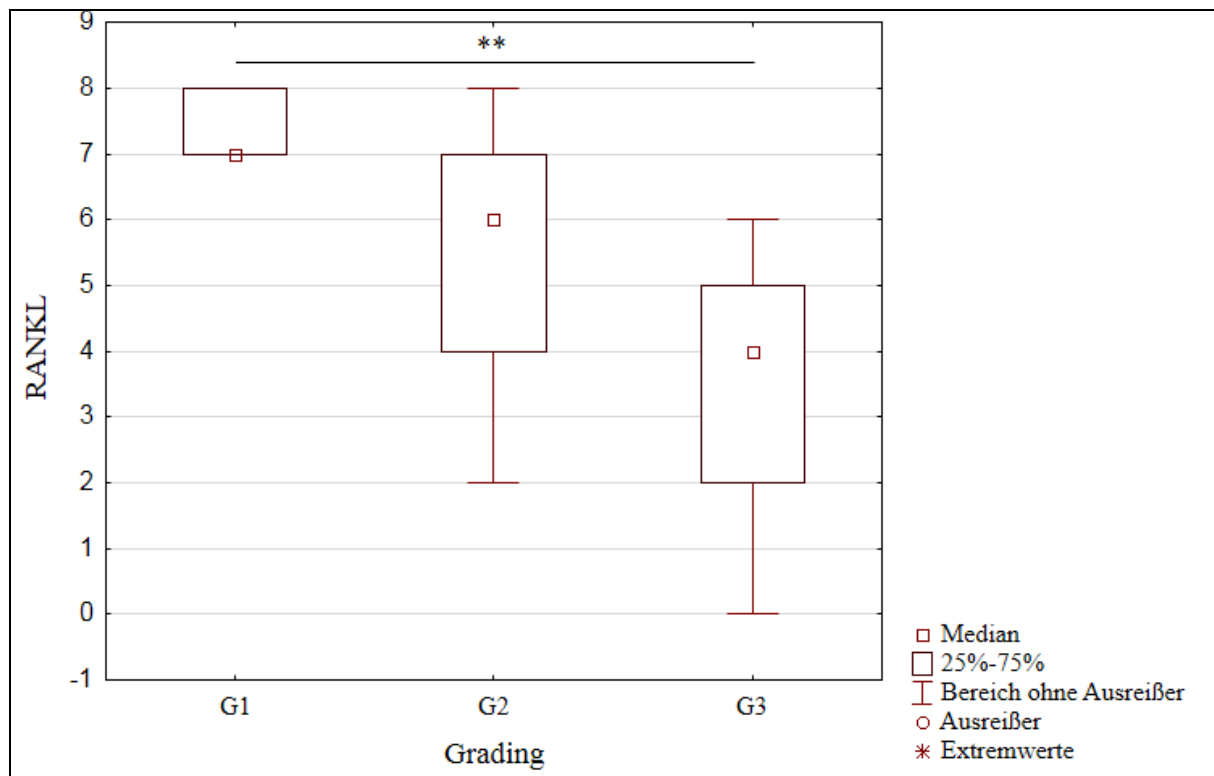
**Abbildung 4-24: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Invasivität (3)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANKL gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von RANKL	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Nicht-invasive Karzinome	7	7	8	13	0,000039
Metastasen	4	2	4.5	11	

**Tabelle 4-11: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der Invasivität (3)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



**Abbildung 4-25: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Grading (G1, G2, G3)**

In diesem Boxplot ist die Expression von RANKL gezeigt (Ordinate), korreliert mit dem Grading (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Grading	Median der Expression von RANKL	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
G1	7	7	8	9	0,0001
G2	6	4	7	9	
G3	4	2.5	5	11	

**Tabelle 4-12: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit dem Grading**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Kruskal-Wallis-Test

#### 4.4.4 Beschreibung der Ergebnisse der Expression von RANKL

##### Wachstumsmuster – TNM-System

Entsprechend der Einteilung des Gesamtkollektivs nach der TNM-Klassifikation liegt der Median der Expression von RANKL in der Gruppe ‚pTa‘ bei 7, die gesamten Werte – also auch die mittleren 50 % – liegen bei 7 und 8.

Die Gruppe ‚pT2‘ zeigt einen Median von 5 bei einer Verteilung der mittleren 50 % zwischen 2 und 6. Maximalwerte liegen diesem entsprechend ebenfalls bei 6, Minimalwerte hingegen gibt es von 0.

Bei einem Median von 4 liegt die Gruppe ‚pT3‘, die mittleren 50 % verteilen sich zwischen 3 und 4.5. Maximalwerte gibt es bei 5 und Minimalwerte bei 2.

Der Median der Gruppe ‚pT4‘ liegt bei 3, die Werte verteilen sich insgesamt zwischen 5 und 0. Die mittleren 50 % liegen bei 2 bis 5.

##### Wachstumsmuster – Invasivität

Eingeteilt nach der Invasivität entspricht die Gruppe ‚pTa‘ der Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ (s.o.). Die Gruppe ‚invasive Karzinome‘ entspricht der Zusammenfassung von ‚pT2‘, ‚pT3‘ und ‚pT4‘ und zeigt einen Median von 4. Die mittleren 50 % dieser Gruppe liegen zwischen 2 und 5, wobei sich die Werte insgesamt zwischen 0 und 6 verteilen. Die Gruppe ‚Metastasen‘ verteilt sich insgesamt zwischen 0 und 6, wobei die mittleren 50 % zwischen 0 und 5 liegen. Der Median dieser Gruppe liegt bei 4.

##### Grading

Differenziert man die Gesamtheit aller Ergebnisse für die Expression von RANKL nach dem histopathologischen Grading, so zeigt sich ein Median für die Gruppe ‚G1‘ von 7, für die Gruppe ‚G2‘ von 6 und für die Gruppe ‚G3‘ von 4. Die gesamten Werte, so auch die mittleren 50 % der Werte von ‚G1‘ liegen zwischen 7 und 8. Von ‚G2‘ liegen die mittleren 50 % der Werte zwischen 4 und 7 bei einem Gesamtspektrum zwischen 2 und 8. Die Gruppe ‚G3‘ zeigt Maximalwerte von 6 und Minimalwerte von 0, die mittleren 50 % liegen zwischen 2 und 5.

##### Statistische Signifikanzen der Ergebnisse für RANKL

Anders als für RANK präsentieren sich die Ergebnisse von RANKL: Hier zeigen sich deutliche Variabilitäten innerhalb aller korrelierten Parameter. Die Expression von RANKL in Abhängigkeit zum TNM-Stadium ist hoch signifikant ( $p=0,00001$ ; s. Abbildung 4-21 und Tabelle 4-8). Auch abhängig von der Invasivität zeigt sich eine hohe Signifikanz zwischen den Gruppen ‚nicht-invasive Karzinome‘ und ‚invasive Karzinome‘ ( $p=0,000006$ , s. Abbildung 4-22 und Tabelle 4-9) sowie zwischen den Gruppen ‚nicht-invasive Karzinome‘

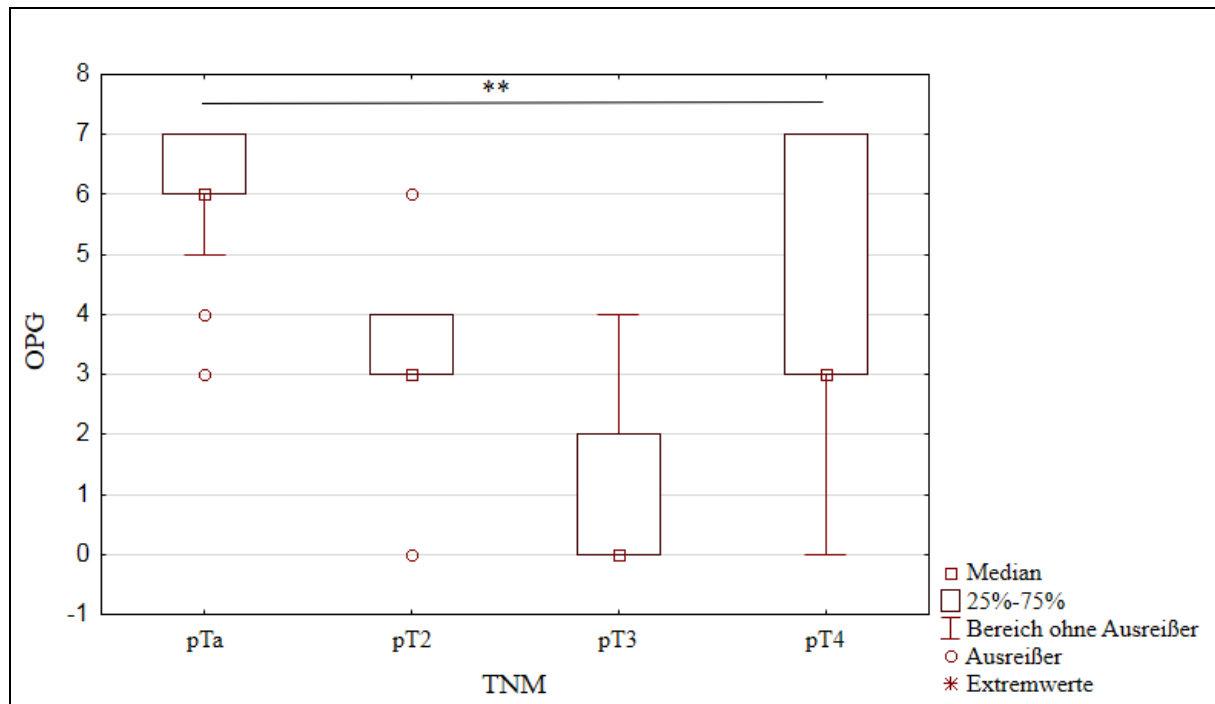
und ‚Metastasen‘ ( $p=0,000039$ ; s. Abbildung 4-24 und Tabelle 4-11). Entsprechend diesen Korrelationen präsentiert sich auch die Korrelation mit dem Grading G1, G2 und G3 – es ergibt sich ebenfalls ein Signifikanzniveau von  $p=0,0001$  (s. Abbildung 4-25 und Tabelle 4-12). Einzig die Korrelation der Gruppen ‚Invasive Karzinome‘ und ‚Metastasen‘ zeigt keine statistische Signifikanz ( $p=0,748399$ , s. Abbildung 4-23 und Tabelle 4-10).

Die Ergebnisse der Korrelationen entsprechen einer inversen Beziehung zwischen der Expression von RANKL zu der Invasionstiefe des Urothelkarzinoms. Je höher sich die Expression von RANKL zum Untersuchungszeitpunkt präsentierte, desto weniger invasiv war das Karzinom bis zu diesem Zeitpunkt gewachsen. Ebenfalls hinsichtlich des Gradings verhält es sich so: Im Rahmen dieser inversen Beziehung zeigt die wenig entdifferenzierte Zelle (also die Zelle, welche nahe am Ursprungsgewebe ist) eine hohe RANKL-Expression, während die Zelle, welche in ihrer Entdifferenzierung weit fortgeschritten ist, eine niedrige RANKL-Expression aufweist.



#### 4.4.5 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Expression von OPG

In diesem Kapitel ist das Expressionsmuster von OPG dargestellt, korreliert mit der TNM-Klassifikation, der Invasivität und dem Grading. Es zeigt sich insgesamt eine inverse Korrelation der Expression mit allen Parametern, welche insgesamt etwas weniger signifikant ist als die Expression von RANKL.



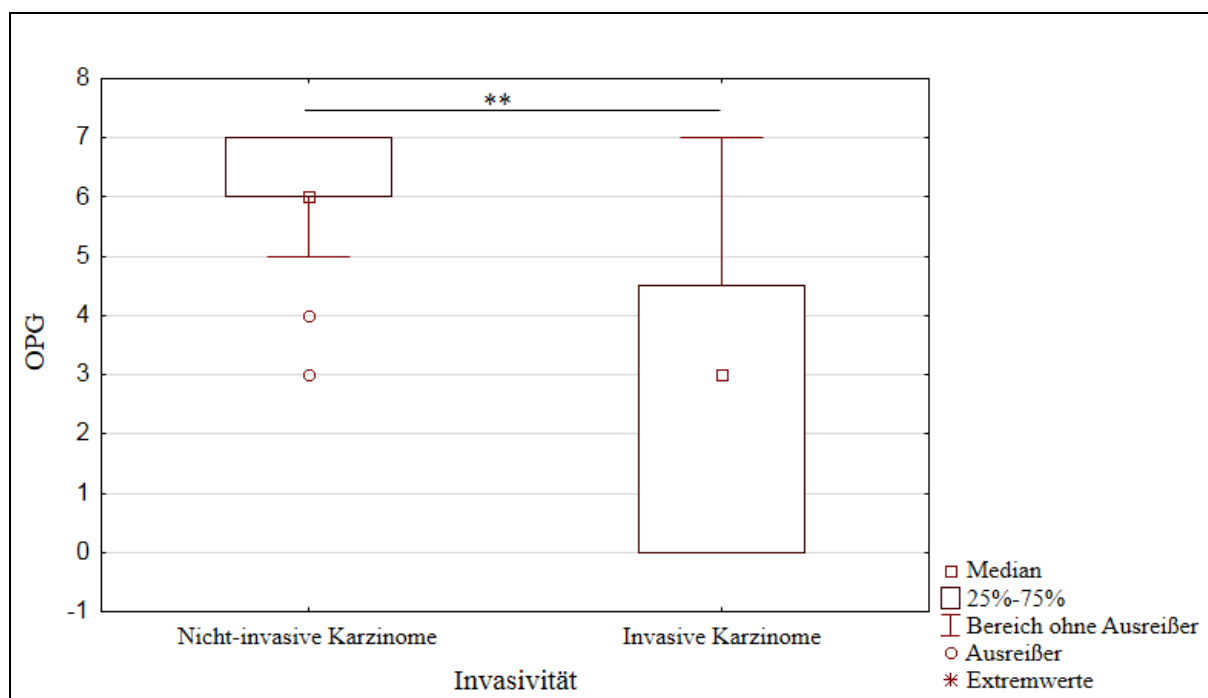
**Abbildung 4-26: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach TNM**

In diesem Boxplot ist die Expression von OPG gezeigt (Ordinate), korreliert mit der TNM-Klassifikation (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

TNM-System	Median der Expression von OPG	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total n	p-Wert*
pTa	6	6	7	13	0,0070
pT2	3	3	4	5	
pT3	0	0	1	4	
pT4	3	3	6	7	

**Tabelle 4-13: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der TNM-Klassifikation**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Kruskal-Wallis-Test



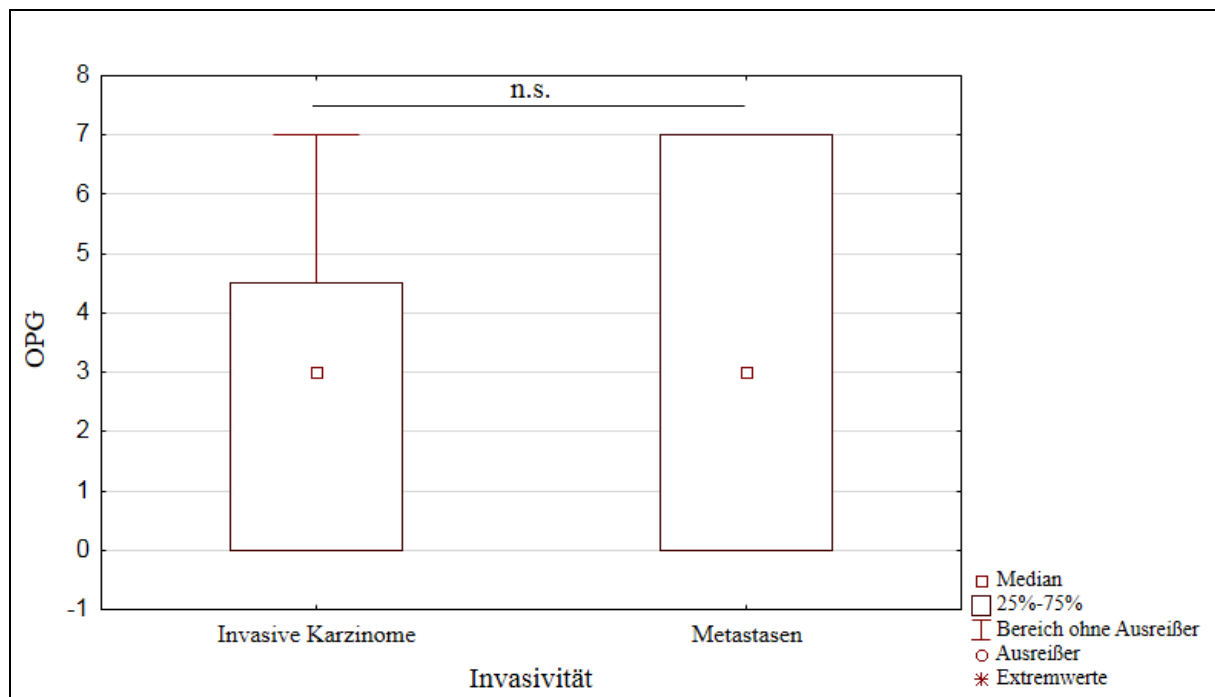
**Abbildung 4-27: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Invasivität (1)**

In diesem Boxplot ist die Expression von OPG gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von OPG	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total n	p-Wert*
Nicht-invasive Karzinome	6	6	7	13	0,002480
Invasive Karzinome	3	0	4.25	16	

**Tabelle 4-14: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der Invasivität (1)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



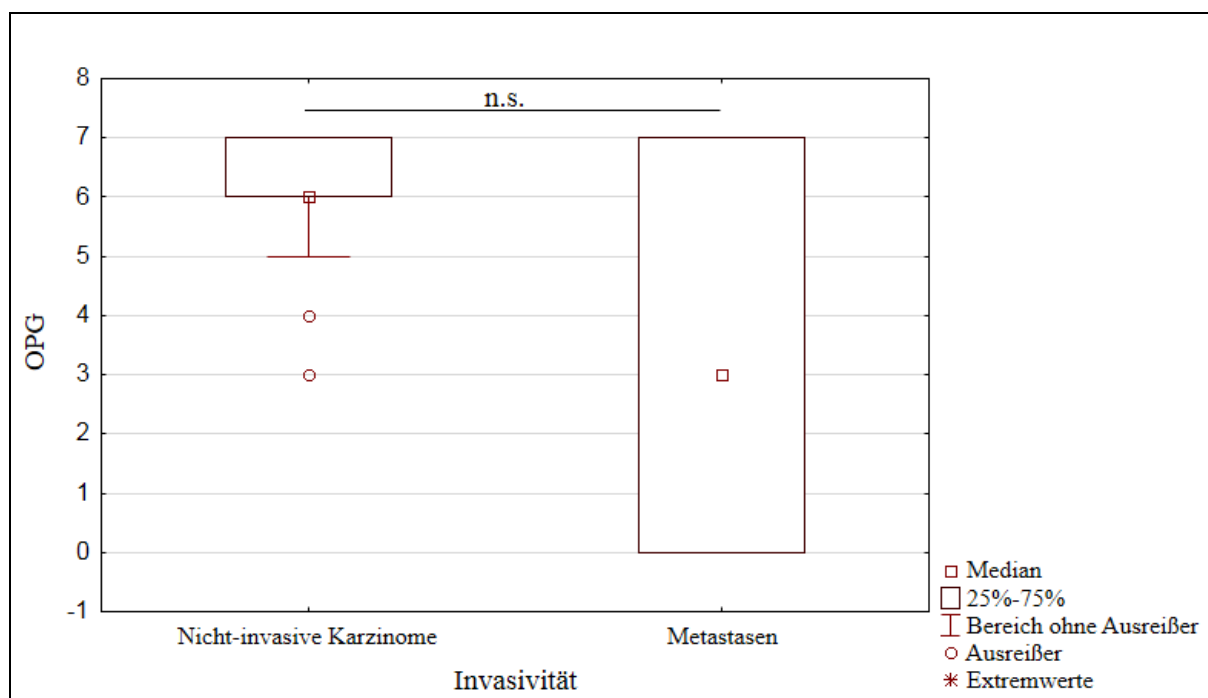
**Abbildung 4-28: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Invasivität (2)**

In diesem Boxplot ist die Expression von OPG gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von OPG	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Invasive Karzinome	3	0	4.25	16	0,674892
Metastasen	3	1	6.5	11	

**Tabelle 4-15: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der Invasivität (2)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



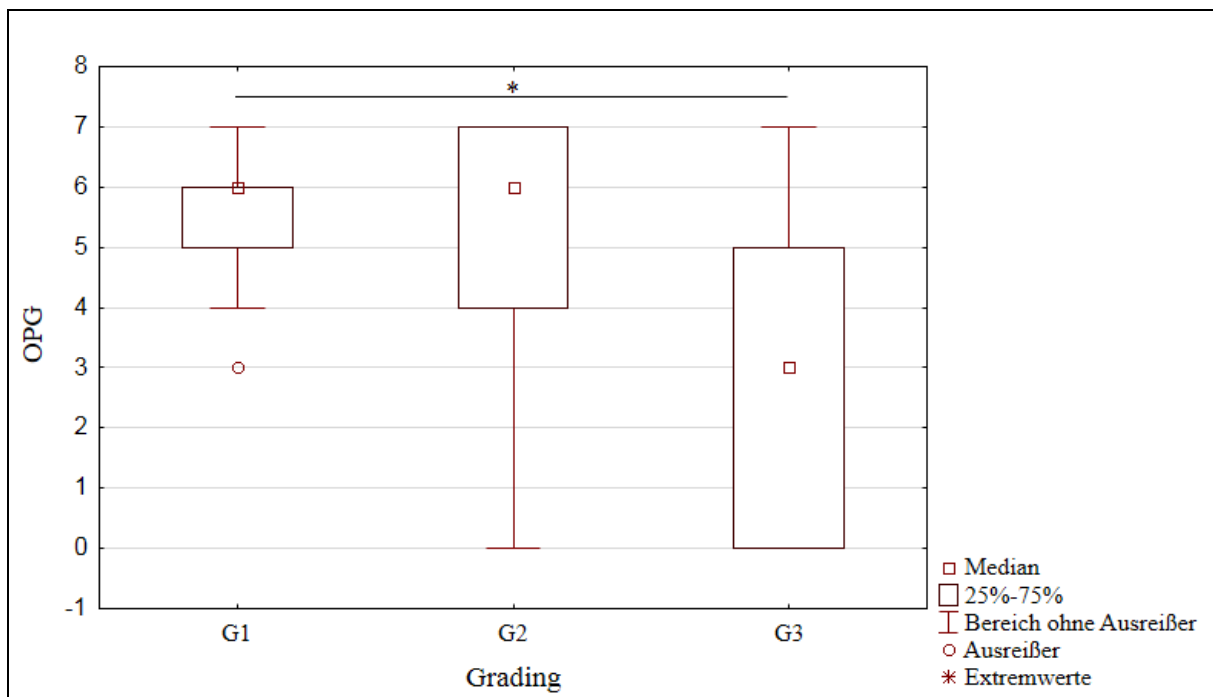
**Abbildung 4-29: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Invasivität (3)**

In diesem Boxplot ist die Expression von OPG gezeigt (Ordinate), korreliert mit der Invasivität (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Invasivität	Median der Expression von OPG	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
Nicht-invasive Karzinome	6	6	7	13	0,068002
Metastasen	3	0	4.25	11	

**Tabelle 4-16: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der Invasivität (3)**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test



**Abbildung 4-30: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Grading (G1, G2, G3)**

In diesem Boxplot ist die Expression von OPG gezeigt (Ordinate), korreliert mit dem Grading (Abszisse). Rechts abgebildet ist die Legende, welche die Symbole Median, 25-75%-Quantil, Bereich ohne Ausreißer, Ausreißer und die Extremwerte erläutert.

Grading	Median der Expression von OPG	25 %-Quantil	75 %-Quantil	total <i>n</i>	p-Wert*
G1	6	5	6	9	0,0289
G2	6	4	7	9	
G3	3	0	4	11	

**Tabelle 4-17: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit dem Grading**

Expression quantifiziert mit dem Allred-Score; \*berechnet mittels Kruskal-Wallis-Test

#### 4.4.6 Beschreibung der Ergebnisse der Expression von OPG

##### Wachstumsmuster – TNM-System

Entsprechend der Einteilung nach der TNM-Klassifikation für die Expression von OPG liegt der Median der Gruppe ‚pTa‘ bei 6, während sich die mittleren 50 % zwischen 6 und 7 verteilen. Maximalwerte liegen bei 7, Minimalwerte (hier Ausreißer) liegen bei 3.

Die Gruppe ‚pT2‘ zeigt einen Median von 3 bei einer Verteilung der mittleren 50 % zwischen 3 und 4. Maximalwerte verteilen sich als Ausreißer bei bis zu 6 und Minimalwerte, ebenfalls als Ausreißer bewertet, bei bis zu 0.

In der Gruppe ‚pT3‘ liegt ein Median von 0 vor, während sich die mittleren 50 % von 0 bis 2 verteilen. Minimalwerte liegen dementsprechend bei 0, Maximalwerte bei 4.

Die mittleren 50 % der Gruppe ‚pT4‘ verteilen sich zwischen 3 und 7, während der Median bei 3 liegt. Maximalwerte liegen bei 7, Minimalwerte bei 0.

##### Wachstumsmuster – Invasivität

Neben der klassischen Einteilung nach dem TNM-System erfolgt auch eine Klassifizierung nach Invasivität. Die Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ aufgeschlüsselt nach dem Wachstumsmuster der Invasivität entspricht der Gruppe ‚pTa‘ im TNM-System (s. o.).

Die Gruppe ‚invasive Karzinome‘ enthält die Gruppen ‚pT2‘, ‚pT3‘ und ‚pT4‘ und zeigt einen Median von 3 bei Maximalwerten 7 und Minimalwerten von 0. Die mittleren 50 % verteilen sich zwischen 4.5 und 0. In der Gruppe ‚Metastasen‘ liegt der Median bei 3, die mittleren 50 % verteilen sich entsprechend der Grenzen der Maximal- und Minimalwerte zwischen 0 und 7.

##### Grading

Differenziert man die Expression von OPG nach dem Grading, so zeigt die Gruppe G1 einen Median von 6 bei einer Verteilung der mittleren 50 % zwischen 5 und 6. Maximalwerte liegen hier bei 7, Minimalwerte bei 4 (Ausreißer bei 3). In der Gruppe G2 zeigt sich ein Median ebenfalls von 6 bei einer Verteilung der mittleren 50 % auf 4-7. Dementsprechend sind Maximalwerte von 7 zu finden, Minimalwerte liegen hingegen bei 0. Die Gruppe G3 hat einen Median von 3 bei Werten der mittleren 50 % zwischen 0 und 5. Minimalwerte liegen bei 0, Maximalwerte bei 7.

##### Statistische Signifikanz für OPG

Wie den graphischen Darstellungen und zugehörigen Tabellen zu entnehmen ist, nimmt die Expression von OPG eine Intermediärstellung im Signifikanzniveau ein. Es zeigen sich einige Variabilitäten innerhalb der korrelierten Parameter: Die Expression von OPG abhängig vom

TNM-Stadium (s. Abbildung 4-26 und Tabelle 4-13) zeigt sich als sehr signifikant ( $p=0,0289$ ). Korreliert man Expressionen von OPG mit dem Wachstumsmuster der Invasivität, so zeigt sich, dass eine hohe Signifikanz zwischen den Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ und ‚invasive Karzinome‘ besteht ( $p=0,002480$ ; s. Abbildung 4-27 und Tabelle 4-14). Nur knapp als nicht signifikant zu bewerten ist die Korrelation zwischen den Gruppe ‚nicht-invasive Karzinome‘ und ‚Metastasen‘ ( $p=0,068002$ ; s. Abbildung 4-29 und Tabelle 4-16). Dieses unterscheidet besonders die sonst analogen, wenn auch weniger ausgeprägten Signifikanzniveaus von OPG von den Signifikanzniveaus von RANKL. Ferner zeigt sich die Korrelation von den Gruppen ‚invasive Karzinome‘ mit ‚Metastasen‘ als nicht signifikant ( $p=0,674892$ ; s. Abbildung 4-28 und Tabelle 4-15). Die Korrelation der einzelnen Gruppen der Klassifikation des Gradings zeigte ein Signifikanzniveau von  $p=0,0289$  (s. Abbildung 4-30 und Tabelle 4-17).

Insgesamt stellen sich die Ergebnisse der Expression von OPG als invers korreliert mit der Invasionstiefe des Karzinoms dar. Dieses bedeutet, je weniger invasiv das Karzinom bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme gewachsen ist, desto mehr OPG wird exprimiert. Diese inverse Beziehung ist jedoch nicht so intensiv ausgeprägt wie bei der Expression von RANKL. Es zeigt sich außerdem eine inverse Korrelation zur Entdifferenzierung der einzelnen Zelle: Je näher die Zelle in ihrer Architektur noch am ursprünglichen Urothel aufgebaut ist, desto mehr OPG exprimiert sie – umgekehrt exprimiert sie weniger OPG, je weiter sie sich in ihrer Differenzierung vom Ursprungsgewebe entfernt.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Expression von RANK, RANKL und OPG im Harnblasenkarzinom nachzuweisen und im Rahmen dessen zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen Expression und Grading sowie Staging des Karzinoms vorliegt. Diese zentrale Fragestellung ergab sich mit der Absicht herauszufinden, ob sich RANK, RANKL oder OPG im Verlauf beim Harnblasenkarzinom beispielsweise als Prognosemarker etablieren lassen und ob eine mögliche Expression von therapeutischem Nutzen sein kann.

Das Harnblasenkarzinom liegt in Deutschland beim Mann an vierter Stelle der malignen Krebserkrankungen und nimmt daher im Gesundheitssystem einen hohen Stellenwert ein (Robert Koch-Institut 2013). Knapp 30 % aller Harnblasenkarzinome sind bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose invasiv in die Harnblasenmuskulatur eingewachsen (Taher und Kotb 2006). Die 5-Jahresüberlebensrate des Karzinoms im pT2-Stadium liegt noch bei 80 %, doch wird ein pT3-Stadium diagnostiziert, so sinkt diese Rate bereits deutlich ab (Hiddemann und Bartram 2010; Hautmann 2010). Abhängig von der Infiltrationstiefe bei Erstdiagnose haben bis zu 40 % der Patienten zu diesem Zeitpunkt schon Lymphknoten- oder Fernmetastasen vorliegen (Taher und Kotb 2006), wobei das Skelettsystem mit einer Häufigkeit von bis zu 33 % von den Fernmetastasen betroffen ist (Hiddemann und Bartram 2010). Trotz Therapie liegt die 5-Jahresüberlebensrate des metastasierten Harnblasenkarzinoms nur noch bei 10-20 % (Hautmann 2010; Hiddemann und Bartram 2010). Dieses zeigt, dass es noch einen großen Bedarf an neuen Therapieansätzen und einer Optimierung bestehender Therapien beim Harnblasenkarzinom gibt.

Der Versuch, biochemische Marker zu etablieren, welche die Wahrscheinlichkeit einer stattgehabten oder zukünftigen Metastasierung des Urothelkarzinoms vorhersagen, gestaltet sich als komplex und langwierig. Als erfolgreiches Beispiel haben Taher et al. in ihrer Arbeit „Bone metastases in muscle-invasive bladder cancer“ verschiedene klinisch-pathologische Prognosemarker für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens von Knochenmetastasen bei Patienten mit Harnblasenkarzinom nach erfolgter Therapie etabliert: Als statistisch signifikant zeigten sich ein fortgeschrittenes klinisches Stadium, ein fortgeschrittenes Stadium der histopathologischen TNM-Klassifikation sowie das Vorliegen von mehr als einem unabhängigen pathologischen Risikofaktor. Als Risikofaktor gewertet werden nach Taher et al. ein Staging von pT4a, ein Grading von G3 und der Lymphknotenbefall des Beckens N1.



Es erfolgt eine Einteilung in drei Gruppen, mit dem Vorliegen von keinem, von einem und von mehr als einem Risikofaktor (Taher und Kotb 2006). Von einem Nachweis eines immunhistochemischen Markers, welcher in der Lage sei, das Vorliegen von Knochenmetastasen anzuzeigen, berichten Alcaraz et al.: So sei die Anwendung von ICTP (ein Telopeptid des Typ I Kollagens) laut den Autoren Ocamura et al. (2003) mit grenzwertiger Signifikanz in der Lage, Knochenmetastasen zu detektieren (Alcaraz et al. 2013; Okamura et al. 2003).

Weiter verbreitet und erfolgreicher als der Nachweis von Markern für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens von Knochenmetastasen ist die Etablierung von Prognosemarkern für beispielsweise das Überleben der Patienten bei diagnostizierter Erkrankung. Tsumura et al. präsentieren in ihrer Arbeit die Expression verschiedener Marker wie E-cadherin, CAR, S100A4 und Uroplakin III und haben gezeigt, dass eine abnormale Expression von mehr als einem dieser Marker mit der Krebs-spezifischen Mortalität der Patienten assoziiert ist (Tsumura et al. 2013). Chen et al. haben in ihrer Arbeit „Clinical Significance of Survivin Expression in Patients with Urothelial Carcinoma“ gezeigt, dass der Grad der Expression des Proteins Survivin in Abhängigkeit von der Muskelinvasivität des Karzinoms deutlich variiert. Zusätzlich zeigten sie Unterschiede in der Survivin-Expression abhängig vom Grading des Urothelkarzinoms und eine Korrelation zwischen der Expression und der Prognose (Chen et al. 2014).

In einer Studie von Yildirim et al. konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte c-erbB2- sowie PCNA-(=*proliferating-cell-nuclear-antigen*) Expression signifikant mit dem Grading- und dem Stagingbefund des Harnblasenkarzinoms korreliert (Yildirim et al. 2014).

Desweiteren haben Tabata et al. in einer Studie gezeigt, dass die Expression von dem Protein Nestin im Harnblasenkarzinom als unabhängiger Prognosemarker dienen kann. Außerdem zeigten sie Zusammenhänge zwischen der Nestin-Expression und dem progressionsfreien Überleben sowie zum krebspezifischen Überleben. (Tabata et al. 2014)

Etabliert in der Praxis oder gar nutzbar für eine Therapie sind diese Marker noch nicht. Dieses verdeutlicht, wie schwierig es ist, beispielsweise Oberflächenproteine im klinischen Alltag für Prognosen oder optimierte Therapien tatsächlich zu nutzen. Da sich der RANK-RANKL-OPG-Pathway bereits in der supportiven Therapie der ossären Metastasen des Prostatakarzinoms etabliert hat und zur Verzögerung von SRE genutzt wird, besteht Grund zu der Annahme, dass ein positiver Nachweis dieser Proteine eine analoge, gezieltere Behandlung der Knochenmetastasen des Harnblasenkarzinoms in der Zukunft ermöglichen würde.

Der RANK-RANKL-OPG-Pathway spielt – wie in Kapitel 1.2 erläutert – für die Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts des Knochens eine entscheidende Rolle: Das Verhältnis der einzelnen Bestandteile zueinander ist sensibel aufeinander eingestellt und empfindlich zu regulieren. Eine Störung im Sinne einer Erhöhung oder Erniedrigung einzelner Komponenten kann zu vermehrtem oder vermindertem Knochenauf- und -abbau führen und manifestiert sich in Form verschiedener Krankheiten.

Ein Beispiel hierfür ist die postmenopausale Östrogenmangel-Osteoporose: In menschlichen osteoblastären Zelllinien hat sich ein von 17-Östradiol dosis- und zeitabhängiger Anstieg von OPG gezeigt. Ein Anstieg von OPG führt zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von RANKL und somit zu einem verminderten Knochenabbau. Im Umkehrschluss ergibt sich aus einem Östrogenmangel, wie er häufig bei postmenopausalen Frauen beobachtet wird, eine verminderte OPG-Produktion und ein erhöhter Knochenabbau. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass menschliche Osteoblasten unbehandelter frühpostmenopausaler Frauen vermehrt RANKL produzieren im direkten Vergleich zur Östrogen-behandelten Kontrollgruppe. Eine vermehrte Produktion von RANKL führt zu einer erhöhten Stimulation der Pre-Osteoklasten und bedingt so eine gesteigerte Knochenresorption (Silva und Branco 2011; Vega et al. 2007). Weitere körpereigene Stoffe, die neben Östrogenen zu einer gesteigerten Produktion von OPG führen und somit zum Schutz vor übermäßigem Knochenabbau beitragen, sind Vitamin D<sub>3</sub>, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und TGF- $\beta$  (s. Kapitel 1.2, Abbildung 1-2: Verständigungsmechanismus im Knochenstoffwechsel). Zur verminderten Bildung von OPG und damit zum vermehrten Knochenabbau führen unter anderem Prostaglandin E<sub>2</sub>, Glukokortikoide und IGF-1 (Silva und Branco 2011).

Ein weiteres Beispiel für ein Ungleichgewicht im Knochenstoffwechsel ist die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose. Glukokortikoide stimulieren einerseits die RANKL-Expression der Osteoblasten, während sie andererseits gleichzeitig die OPG-Produktion hemmen. Dieses führt zu erhöhter Knochenresorption bei einem hohen RANKL:OPG-Verhältnis. Messbar ist dieser Vorgang auch in erhöhten Markern für Knochenumbau und -abbau im Urin und Serum des Patienten (Silva und Branco 2011). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass sich in OPG-knockout-Mäusen eine Osteoporose entwickelt (Corey et al. 2005).

Analog zu der Erkrankung der Osteoporose haben Versuche in Mäusen gezeigt, dass eine pathologisch gesteigerte Expression von OPG zu Osteopetrose (=Marmor Knochenkrankheit; ungezielte Bildung von Knochenmasse ohne notwendige Resorption) führt (Corey et al. 2005). Auch ein Ausfall der RANKL-Produktion z. B. durch eine Genmutation führt ebenfalls

---

zur Osteopetrose (Corey et al. 2005; Silva und Branco 2011). Osteopetrose kann durch einen Fehler in der Osteoklastenformation, durch einen Fehler in der Osteoklastenaktivierung oder durch einen absoluten Mangel an Osteoklasten entstehen (Boyce und Xing 2007, 2008).

Neben den o. g. Stoffwechselerkrankungen des Knochens, an deren Pathophysiologie der RANK-RANKL-OPG-Pathway beteiligt ist, nutzen auch maligne Erkrankungen des Knochens in eigenem Interesse diesen Mechanismus aus. Ein Beispiel hierfür ist das Multiple Myelom: Myelomzellen sind in der Lage, vermehrt RANKL zu exprimieren. Dieses geschieht in diesem Fall als Reaktion auf einen Stimulus durch IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ . Parallel dazu führt IL-7 zu einer Expression von RANKL durch T-Lymphozyten. Zusätzlich zu dieser gesteigerten RANKL-Bildung wird OPG vermindert exprimiert, was insgesamt zu einem gestörten Gleichgewicht im Sinne einer vermehrten Osteolyse führt. Als weiterer Mechanismus in der Pathologie des Multiplen Myeloms exprimiert das Malignom zusätzlich ein weiteres Protein: dickkopf-1. Dieses Protein hemmt mittels negativer Regulation die Osteoblastogenese und inhibiert damit gleichzeitig zur gesteigerten Osteolyse die Knochenneubildung (Fulciniti et al. 2009). Mit Hilfe dieser Mechanismen und der Nutzung des Pathways gelingt es dem Multiplen Myelom, osteolytische Läsionen zu bilden und auf diese Weise optimierte Bedingungen sowie Raum für das eigene Wachstum in der Umgebung des Knochens zu schaffen. (Vega et al. 2007)

Den Stellenwert von OPG machten auch Croucher et al. in ihrer Arbeit deutlich, da sie zeigen konnten, dass die Behandlung von Mäusen, welche ein Multiples Myelom aufwiesen, mit rekombinantem OPG zu einer signifikanten Reduktion von osteolytischen Herden führte (Croucher et al. 2001).

Neben der Expression von RANK, RANKL und OPG im Knochen und den damit verbundenen Krankheiten ist besonders im Hinblick auf diese Studie die Tatsache von großer Bedeutung, dass RANK, RANKL und OPG vielfach auch in anderen Organen gebildet werden können.

RANKL als Mitglied der TNF-Superfamilie wird neben dem Knochen auch in der Lunge, im Knochenmark, in der Brustdrüse (Santini et al. 2011b) und in lymphatischem Gewebe gebildet. Außerdem wird es von verschiedenen malignen Tumorzellen sezerniert. (Silva und Branco 2011; Boyce und Xing 2007).

RANK, welches zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehört, wird ebenfalls im Skelettmuskel produziert, aber auch im Thymus, in der Leber, im Colon, in der Brustdrüse und in der

Prostata. Auch Zellen des Monozyten- bzw. Makrophagen-Systems, wie zum Beispiel B- und T-Lymphozyten, dendritische Zellen oder Fibroblasten, sind zur Bildung von RANK in der Lage. (Silva und Branco 2011)

OPG, ebenfalls Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, kann unter anderem in der Lunge, im Herzen, in der Niere und der Leber, im Thymus, in Lymphknoten, in Zellen der glatten Muskulatur von Gefäßen und in Chondrozyten gebildet werden. (Boyce und Xing 2008)

Vielfältigen Angaben aus der Literatur ist also zu entnehmen, dass der RANK-RANKL-OPG-Pathway an vielen Stellen im menschlichen Körper an Interaktionen und Stoffwechselwegen beteiligt ist. (Boyce und Xing 2007, 2008)

Neben der physiologischen Expression von RANK, RANKL und OPG im Knochen sowie dem gestörten Gleichgewicht in den o. g. Krankheiten des Knochens und der Expression in verschiedenen Organen ist für diese Studie von elementarer Bedeutung, dass in der Vergangenheit gesteigerte Expressionen der einzelnen Proteine in unterschiedlichen soliden Tumoren (/Malignomen) nachgewiesen worden sind. Der Nachweis dieser Expressionen ist einerseits mit einer gesteigerten Zellmigration der Krebszellen und andererseits mit der Schaffung von optimierten Bedingungen für ein Knochenmilieu assoziiert, welches eine sich anschließende Metastasierung ermöglicht.

Als erstes soll ein Vergleich zwischen der Expression im Nierenzellkarzinom und dieser Studie durchgeführt werden:

Wie auch das Harnblasenkarzinom bildet das Nierenzellkarzinom mit einer Häufigkeit von etwa 30 % Knochenmetastasen. Die Metastasen beider Entitäten sind gleichermaßen osteolytisch. Auch die den Patienten belastenden Folgen sind – unabhängig vom Primärtumor – die gleichen: Von Schmerzen im Skelettsystem über eine Einschränkung der Lebensqualität bis hin zum Tod der Patienten durch Komplikationen der Metastasen.

In ihrer Studie „Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas“ wiesen Mikami et al. eine gesteigerte Expression von RANK und RANKL im Nierenzellkarzinom (RCC) nach. Im Vergleich zu anderen Entitäten (papillär, chromophob) ist besonders die Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom deutlich gesteigert. Auch das erhöhte RANKL:OPG-Verhältnis, welches einen gesteigerten Knochenabbau bedingt, zeigte sich im klarzelligen RCC höher als in den anderen Entitäten. Es wird angenommen, dass die gesteigerte Expression in den Karzinomzellen stattfindet und

nicht in ursprünglichen Zellen der Niere. Nach Mikami et al. zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Expression von RANK und RANKL und dem Staging des RCC.

Vergleicht man die Ergebnisse von Mikamis Studie mit den Ergebnissen dieser Studie, so zeigen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede: Gemein ist, dass der Nachweis einer RANK- und RANKL-Expression in beiden Malignomen insgesamt positiv ausfiel. Es unterschied sich jedoch darin, dass bei der Expression von RANKL im RCC eine positive Korrelation mit dem Staging vorlag, während sich in der vorliegenden Studie eine inverse Korrelation zeigte – je weniger invasiv das Karzinom zum untersuchten Zeitpunkt vorlag, desto höher war die nachgewiesene RANKL-Expression (s. Kapitel 4.4.3 und 4.4.4). Auch der Nachweis von RANK im Harnblasenkarzinom in dieser Studie ist nicht direkt analog zum Nachweis von RANK im RCC. Die RANK-Expression im RCC korreliert positiv mit dem Stagingbefund, im Harnblasenkarzinom in dieser Studie ist – bei nachgewiesener Expression – keine Korrelation nachzuvollziehen (s. Kapitel 4.4.1 und 4.4.2). Besonders hervorzuheben ist allerdings der Vergleich vom RANKL:OPG-Verhältnis im RCC zum RANKL:OPG-Verhältnis im Harnblasenkarzinom, denn hier verhält es sich gleichermaßen: Im RCC ist dieses Verhältnis erhöht, was sowohl der Schaffung von Osteolysen im Knochen als Vorbereitung auf eine ossäre Metastasierung entsprechen kann, als auch der Migration im Allgemeinen dienen kann. Im Harnblasenkarzinom zeigt sich dieses Verhältnis ebenfalls erhöht. Die OPG-Expression ist, wie die RANKL-Expression, in der vorliegenden Studie ebenfalls invers korreliert mit dem Staging und dem Grading, jedoch insgesamt niedriger ausgeprägt als die RANKL-Expression (s. Kapitel 4.4.5 4.4.6). Dieser Umstand bedingt, wie bereits erklärt, allgemein ein Milieu, in welchem Knochenresorption stattfindet.

Von elementarer klinischer Relevanz ist die Tatsache, dass RCC-Patienten mit einem erhöhten RANKL:OPG-Verhältnis zwei Jahre nach Nephrektomie vermehrt Knochenmetastasen aufweisen. Analog hierzu entwickelten Patienten mit einem hohen OPG zum Operationszeitpunkt im Anschluss keine Knochenmetastasen. Dieses Ergebnis hebt den Stellenwert von RANK, RANKL und OPG im Bezug auf die Migration der Malignome in den Knochen und damit auf das Gesamtüberleben der Erkrankten besonders hervor. Von besonderer Bedeutung wäre also hier ein analoges, weiteres Studienmodell denkbar, welches genau diese Fragestellung, nämlich die Frage nach eine Korrelation von RANKL und OPG mit der Wahrscheinlichkeit von Metastasen im Verlauf, untersuchen und beurteilen würde. Dieses war jedoch nicht Schwerpunkt und Gegenstand dieser Studie, so dass ein Vergleich an dieser Stelle rein spekulativer Natur wäre.

Bei Patienten mit einem RCC zeigte sich in derselben Studie außerdem, dass eine nicht-gesteigerte Expression von RANK und RANKL mit einem längeren metastasenfrem Überleben assoziiert ist. Der Nachweis eines erhöhten OPG, wie sich in der vorliegenden Studie im nicht-invasiven Karzinom zeigte, konnte von Mikami et al. mit dem Ausbleiben von Metastasen assoziiert werden. RCC-Patienten mit einem erhöhten OPG zeigten insgesamt ein längeres krankheitsfreies Überleben als Patienten mit niedrigem OPG. Eine Konstellation von RANK▲, RANKL▲ und OPG▼ konnte von Mikami et al. als unabhängiger Marker für eine kürzere Metastatenfreiheit, ein kürzeres Gesamtüberleben und ein kürzeres krankheitsspezifisches Überleben etabliert werden. Als entscheidend an der Expression von RANK und RANKL in den RCC-Zellen wird angesehen, dass RANKL zu einer Triggerung von der Migration von RANK-exprimierenden Krebszellen führt. (Mikami et al. 2009)

Dieses deckt sich partiell mit der These der vorliegenden Studie, dass RANK und RANKL für die Entdifferenzierung und die Migration der urothelialen Krebszelle ebenfalls von Bedeutung sind, wenngleich sich die Expression von RANKL im Harnblasenkarzinom in invasiveren Stadien regredient entwickelt.

In der vorliegenden Studie wurden keine Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Harnblasenkarzinom-Patienten und keine *follow-up*-Untersuchung im Sinne einer Erhebung der RANK-RANKL-OPG-Expression im Verlauf durchgeführt. Auch Variabilitäten der Expressionen im zeitlichen Verlauf wurden hinsichtlich möglicher folgender Metastaten nicht untersucht. Daher bleibt an dieser Stelle offen, ob ähnliche Ergebnisse wie bei Mikami et al. zu erwarten sind. Es empfiehlt sich, weitere Studie mit einem größeren Kollektiv sowie mit der Korrelation zum Überleben anzuschließen, um eine Aussage diesbezüglich treffen zu können.

Neben dem RCC existieren weitere Studien, welche als Referenz für unsere Studienergebnisse Verwendung finden. Auf Grund der Tatsache, dass in der medikamentösen Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms der RANK-RANKL-OPG-Pathway bereits genutzt wird, nimmt diese maligne Erkrankung als Vergleichswert für diese Studie den höchsten Stellenwert ein. Die Mehrheit der Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom entwickelt im Verlauf ihrer Erkrankung Knochenmetastaten. Wie auch die Patienten, welche an Knochenmetastaten durch ein Harnblasenkarzinom oder ein Nierenzellkarzinom erkrankt sind, leiden die Betroffenen unter den Folgen dieser Metastaten: Sogenannte *skelett-related events* (=SRE, engl. für Skelett-bezogene Komplikationen: Frakturen, Notwendigkeit einer Bestrahlung des Knochens, Notwendigkeit eine operativen Therapie zur Schmerzkontrolle

und zum Schutz vor Frakturen, Rückenmarkskompressionen, Gomez-Veiga et al. 2013), Elektrolytentgleisungen (bes. Kalzium) und Schmerzen stellen schwerwiegende Belastungen dar.

Bevor sich der Pathway therapeutisch nutzen ließ, wurden an Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom bereits viele Untersuchungen durchgeführt, welche *in vivo* und *in vitro* die veränderten Expressionen von RANK, RANKL und OPG gezeigt haben.

So zeigten beispielsweise Chen et al. in ihrer Studie „Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation“ sowohl in Zelllinien des Prostatakarzinoms *in vitro* als auch im Prostatakarzinom inkl. Knochenmetastasen *in vivo*, dass die Expressionen aller drei Bestandteile des RANK-RANKL-OPG-Pathways pathologisch erhöht sind. Chen et al. zeigten außerdem, dass die Expression von RANK, RANKL und OPG im gesunden Prostatagewebe niedrig war, verglichen mit der signifikant erhöhten Expression im Prostatakarzinom. Analog zu diesen Ergebnissen präsentieren sich auch unsere Ergebnisse mit einer gesteigerten Expression aller drei Proteine im Harnblasenkarzinom im Vergleich zum normalen Urothel (s. Kapitel 4.2.2.1, 4.2.2.2 und 4.2.2.3; s. außerdem Kapitel 4.4.1, 4.4.3 und 4.4.5). Die Ergebnisse der Arbeit von Chen et al. wurden mit möglichen klinisch-pathologischen Einflussfaktoren korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine klare positive Korrelation zwischen den nachgewiesenen gesteigerten Expressionen und dem Tumorstaging und -grading sowie zum Gleason-Score, dem Androgenrezeptor-Status und dem Serum-PSA vorliegt. Diese Marker gelten als etabliert in der Einstufung eines Therapiekonzepts des Prostatakarzinoms sowie in der Beurteilung der Prognose. Diese positive Korrelation bedeutet, dass ein fortgeschrittenes Prostatakarzinom-Leiden mit stattgehabter Metastasierung mit erhöhten Expressionen der drei Proteine assoziiert ist. Selbige Ergebnisse erhebt und präsentiert auch Zafeirakis in seiner Studie (Zafeirakis 2010).

Wie auch in der Gegenüberstellung zum RCC zeigen sich im Vergleich zu der Arbeit von Chen et al. Gemeinsamkeiten und Unterschiede mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie: Zwar ist bei den vorliegenden Ergebnissen auch eine gesteigerte Expression aller drei Proteine im Vergleich zum Normalgewebe nachweisbar (s. Kapitel 4.2.2.1, 4.2.2.2 und 4.2.2.3; s. außerdem Kapitel 4.4.1, 4.4.3 und 4.4.5), jedoch besteht nur bei der Expression von RANKL und OPG eine Korrelation mit dem Grading und dem Staging des Harnblasenkarzinoms. Anders als in der Studie von Chen et al. zeigten sich diese Korrelationen allerdings als invers. Je weiter die Invasivität und das Grading des Harnblasenkarzinoms fortgeschritten sind, desto geringer fällt der Nachweis von RANKL und

OPG aus (s. Abbildung 4-21, Abbildung 4-22, Abbildung 4-24 und Abbildung 4-25 sowie Abbildung 4-26, Abbildung 4-27, Abbildung 4-30 ). Die Korrelation zwischen RANKL und dem Stagingbefund erreicht ein hochsignifikantes Niveau (TNM-Klassifikation:  $p=0,00001$ ; Invasivität (nicht-invasiv zu invasiv):  $p=0,000006$ ), während die Korrelation mit dem Gradingbefund als sehr signifikant ( $p=0,0001$ ) einzustufen ist. Ähnlich verhält es sich mit der Expression von OPG: Auch hier zeigt sich die Korrelation vom Staging als sehr signifikant (TNM-Klassifikation:  $p=0,0070$ ; Invasivität (nicht-invasiv zu invasiv):  $p=0,002480$ ) und vom Grading als signifikant ( $p=0,0289$ ). Die Expression von RANK hingegen zeigte sich nicht spezifisch abhängig von der TNM-Klassifikation und dem Grading (s. Abbildung 4-16, Abbildung 4-17, Abbildung 4-18, Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20).

Zusätzlich zeigte sich bei Chen et al. wie auch bei Corey et al., dass das höchste Verhältnis von OPG zu RANKL in den Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms selbst vorlag, verglichen mit dem Verhältnis im Primärtumor (Corey et al. 2005; Chen et al. 2006). Dieses Ergebnis unterscheidet sich wesentlich von den zuvor diskutierten Ergebnissen aus der Studie von Mikami et al. am RCC, welche umgekehrt ein hohes Verhältnis von RANKL zu OPG gezeigt hatten. Dieses ergibt Sinn vor dem Hintergrund, dass ossäre Metastasen von Prostatakarzinomen einen wesentlichen osteoblastischen Anteil aufweisen, wozu ein höherer Anteil an OPG nützlich ist, während das RCC osteolytische Metastasen ausbildet und hierfür vermehrt RANKL benötigt. Dass es sich in der hier vorliegenden Studie bzgl. des RANKL:OPG-Verhältnisses gleich wie beim RCC verhält, passt dementsprechend zu der Tatsache, dass die ossären Metastasen des Harnblasenkarzinoms ebenfalls von osteolytischer Natur sind. (Chen et al. 2006)

Neben den Untersuchungen am Prostatakarzinom *in vivo* konnten auch Untersuchungen *in vitro* verschiedene Pathologien im Pathway aufweisen: Armstrong et al. haben in ihrer Arbeit „RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes“ gezeigt, dass Prostatakarzinomzellen (Zelllinie PC3) RANK auf ihrer Oberfläche exprimieren und dass das Vorhandensein von RANKL einen signifikanten migrationsfördernden Effekt hat. Zhang et al. haben an *in vitro*-Untersuchungen auch gezeigt, dass Prostatakrebszellen RANKL exprimieren können und damit die Knochenresorption stimulieren können (Zhang et al. 2001). Zusätzlich zeigte die Studie von Zhang et. al auch, dass eine künstliche OPG-vermittelte Inhibierung der Osteoklastengnese mit einem reduzierten Wachstum der Krebszellen im Knochenmilieu assoziiert war (Zhang et al. 2001). Neben Untersuchungen am Prostatakarzinom wiesen Yamada et al. in einer Studie



---

zum HNSCC (=head neck squamous cell carcinoma; dt.: Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs) auch nach, dass RANKL für den Tumor essentiell notwendig ist, um eine adäquate Tumorzellformation erstellen zu können. Auch war hier eine positive Korrelation von RANKL mit dem Grading, nicht jedoch mit der TNM-Klassifikation möglich. Zusätzlich hielten Yamada et al. fest, dass es Unterschiede in der Expression von RANKL *in vivo* zu *in vitro* gab, so dass ein direkter Vergleich nicht unbedingt immer möglich und sinnvoll ist. (Yamada et al. 2011)

Ferner zeigte sich in der Studie von Armstrong et al., dass die Interaktion der Prostatakarzinomzellen der Zelllinie PC3 mit der Umgebung des Knochens zu einer außerordentlichen Steigerung von RANKL im Knochen führt. Anders als bei Chen et al. lagen hier erhöhte Raten von RANKL zu OPG vor. Diese kontroversen Ergebnisse sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass es sich um den Vergleich eines *in vivo*-Ergebnisses mit einem *in vitro*-Ergebnis handelt. Hinzu kommt, dass die ossäre Metastase des Prostatakarzinoms pathophysiologisch sowohl osteolytische als auch osteoblastische Komponenten aufweist (Zhang et al. 2001). Möglich ist also, dass es sich im Modell um überwiegend osteolytische Metastasen handelt, während *in vivo* die osteoblastische Komponente überwiegen kann, so dass beide Ergebnisse unter diesem Aspekt durchaus miteinander vereinbar sind.

Der Stellenwert der veränderten Expression wurde von Armstrong et al. mithilfe der Blockierung von RANKL durch einen OPG-ähnlichen Antikörper demonstriert: Nicht nur die Malignom-induzierte Osteoklastenentwicklung wurde auf diese Weise supprimiert, sondern auch die gesamte Tumorlast konnte reduziert werden. Dieses geschieht entweder auf direktem Weg mittels der Inhibierung oder indirekt durch allgemeine Auswirkungen der Antikörper auf das Knochenmilieu. (Armstrong et al. 2008). Für den indirekten Weg sprechen sich Corey et al. in ihrer Studie aus, da ihre Ergebnisse aufzeigen, dass OPG das Wachstum des primären Prostatakarzinoms nicht hemmt, sich allerdings auf Tumorwachstum und Malignomcharakteristika im Knochenmilieu indirekt auswirkt (Corey et al. 2005).

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse mit denen von Armstrong et al., zeigen sich dieselben Gemeinsamkeiten und Unterschiede wie bisher: Eine gesteigerte Expression aller drei Proteine ist in der vorliegenden Studie ebenfalls nachweisbar. Besonders hervorzuheben ist außerdem die Gemeinsamkeit, dass Armstrong et al. ebenfalls keine Korrelation von der Expression von RANK mit dem Grading und Staging angeben. Der elementare Unterschied ist, wie bisher, die hier inverse Korrelation von RANKL und OPG mit der Invasivität des

Harnblasenkarzinoms in der vorliegenden Studie verglichen mit der positiven Korrelation von RANKL und der Invasivität des Prostatakarzinoms in der Studie von Armstrong et al..

Ferner haben Mori et al. an Untersuchungen von Prostatakarzinomzellen (DU145) nachgewiesen, dass RANKL einen direkten Einfluss auf RANK-exprimierende Prostata-Tumorzellen hat und sich positiv auf deren Migration auswirkt (Mori et al. 2007). Ob sich ein solcher Effekt auch bei Zelllinien des Harnblasenkarzinoms nachweisen ließe, bleibt derzeit Gegenstand weiterer Studien.

Um einen direkten Vergleich zu den *in vivo*-Expressionen im Prostatakarzinom sowie dessen Metastasen möglich zu machen, wie oben diskutiert, wäre eine gezielte Untersuchung von RANK und RANKL auch in der Knochenmetastase des Harnblasenkarzinoms notwendig.

Dieses Modell haben Santini et al. in ihrer Studie „Expression pattern of receptor activator of NFkappaB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases“ durchgeführt. Sie haben die Expression von RANK in Primärtumoren unterschiedlicher Karzinomentitäten (kolorektales Karzinom, Bronchial-Ca, Mamma-Ca u. a.) mit der Expression von RANK in den zugehörigen Knochenmetastasen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass es einen konkordanten Zusammenhang zwischen der Expression im Primärtumor und den zugehörigen Metastasen gibt. Sie geben jedoch an, dass es sich insgesamt eher um eine Abhängigkeit von der Histopathologie des Primärtumors handelt, als um wesentliche Unterschiede zwischen dem Primärtumor und der zugehörigen Metastase. (Santini et al. 2011a)

Damit unterscheiden sich ihre Ergebnisse hingegen von denen von Chen et al., da sie in ihrer Studie eine höhere Expression von RANK in der Metastase als im Primärtumor des Prostatakarzinoms verzeichnet hatten (Chen et al. 2006).

Gesondert zu betonen ist allerdings, dass in der Studie von Santini et al. in einigen Tumorentitäten gar kein Nachweis von RANK gelang. Eine dieser Entitäten war unter anderem das Harnblasenkarzinom. Dieses Ergebnis ist nicht deckungsgleich mit den vorliegenden Ergebnissen, da wir einen Nachweis von RANK im Urothelkarzinom erbringen konnten (s. Kap. 4.2.2.1 und Kap. 4.4.2), wenngleich dieser Nachweis in Korrelation zur TNM-Klassifikation nicht statistisch signifikant war.

Andere Ergebnisse als die bisher diskutierten zeigen Jung et al. in ihrer Arbeit, in welcher sie das Serum von Patienten mit einem Prostatakarzinom untersuchten: Aus den Ergebnissen ihrer Studie geht hervor, dass OPG im Serum von Patienten mit einem ossär metastasierten Prostatakarzinom erhöht ist im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe,

Prostatakarzinompatienten ohne Knochenmetastasen und Patienten mit einer BPH, während RANKL im Serum diese Veränderung nicht aufweist. Das Verhältnis von OPG zu RANKL zeigt sich dementsprechend im Serum erhöht (Jung et al. 2003). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Ergebnissen von Chen et al. und Corey im zumindest Hinblick auf den RANKL-Anstieg, da in den beiden anderen Studien ein Anstieg nachweisbar war. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Chen et al. und Corey et al. ist allerdings das von Jung et al. gezeigte erhöhte Verhältnis von OPG zu RANKL, welches der Theorie entspricht, dass die ossäre Metastase des Prostatakarzinoms eine wesentliche osteoblastische Komponente aufweist.

Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den vorliegenden Ergebnissen überein, da sich in dieser Studie ein erhöhtes RANKL:OPG-Verhältnis zeigte. Dieses liegt möglicherweise daran, dass es sich bei unserer Studie nicht um den Nachweis der Proteine im Serum handelt, sondern um den immunhistochemischen Nachweis direkt im Gewebe. Auch von den Autoren der verglichenen Studien wird diskutiert, ob die Serumwerte überhaupt den Werten im lokalen Milieu entsprechen. Um also einen gleichwertigen Vergleich durchführen zu können, ist es notwendig, weitere Studien anzuschließen, welche sich mit dem Nachweis von OPG und RANKL, aber auch RANK im Serum von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom und ossären Metastasen befassen. Um einen vollständigen Vergleich zwischen den Serumwerten und den lokalen Expressionen zu erbringen, wäre es sinnvoll, innerhalb einer Studie sowohl die Serumwerte der Proteine zu bestimmen, als auch gleichzeitig bei denselben Patienten einen immunhistochemischen Nachweis im lokalen Milieu zu erbringen.

Neben den o. g. Studien präsentierten Todenhöfer et al. in ihrer Studie, dass sich die Serumwerte für RANKL zwischen Patienten, welche an einer benignen Prostatahyperplasie erkrankt sind nicht unterschieden zu Patienten, welche an einem Prostatakarzinom erkrankt sind. Allerdings wiesen die Ergebnisse für OPG Unterschiede auf: Patienten mit einem Prostatakarzinom zeigten ein deutlich niedrigeres OPG im Serum als Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie. Daraus ergibt sich, dass das Verhältnis von OPG zu RANKL bei Patienten mit Prostatakarzinom erniedrigt ist und somit Bedingungen für eine Osteolyse geschaffen sind. Zusätzlich präsentierten sie die Ergebnisse für Patienten mit manifesten Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom: Hier stieg das OPG erneut an, somit zeigte sich ein erhöhtes Verhältnis von OPG:RANKL. Als möglicher Erklärungsansatz wird von Todenhöfer et al. die These vorgebracht, dass das Prostatakarzinom durch niedrige OPG-Werte zunächst Osteolysen ermöglicht und somit den Knochen auf eine mögliche Einnistung

von Prostatakarzinomzellen vorbereitet, während nach stattgehabter Metastasierung die osteoblastische Komponente überwiegen darf (erneute Osteoprotektion) und deswegen das OPG ansteigt. (Todenhöfer et al. 2013).

Diese Kernaussage der These von Todenhöfer et al. deckt sich im Grunde mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, dass RANKL vom nicht-invasiven Karzinom exprimiert wird, um so dessen Migration vorzubereiten und optimierte Bedingungen im Knochen für eine mögliche folgende Einnistung von Karzinomzellen vorzubereiten, während es für das invasive Karzinom mit stattgehabter Metastasierung nicht mehr von derartiger Relevanz ist. Auch hier wäre es von Bedeutung, eine Serumuntersuchung von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom durchzuführen, um einen direkten Vergleich erstellen zu können.

Wie bereits oben erläutert, stellt vor allem das metastasierte Harnblasenkarzinom behandelnde Ärzte wegen der schlechten 5-Jahresüberlebensraten vor eine große Herausforderung: Die Standard-Therapie hat nahezu immer einen palliativen Charakter. Sie besteht aus einer systemischen medikamentösen Chemotherapie mit Gemcitabine und Cisplatin. Alternativen hierzu stellen Therapien nach dem MVAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin), dem MVEC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin, Cisplatin) oder dem CMV-Schema (Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin) dar. Diese Kombinationen weisen jedoch höhere Nebenwirkungsprofile auf. Insgesamt ist die Prognose eines metastasierten Harnblasenkarzinoms mit einer Langzeit-Überlebensrate von fünf Jahren mit 10-20 % trotz Therapie als eher gering anzusehen. (Hautmann 2010; Hiddemann und Bartram 2010)

Die Folgen der Metastasen und die Belastungen, welche hierdurch entstehen, hängen im Wesentlichen von ihrer Lokalisation ab. Die für diese Studie relevanten Knochenmetastasen treten mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 30 % auf und bedingen die Gefahr der skeletal-related events (SRE). Diese SRE stellen, wie bereits erläutert, auch beim metastasierten Prostatakarzinom eine wesentliche Komplikation dar. Speziell an den ossären Metastasen des Prostatakarzinoms konnte ein Medikament entwickelt werden, welches in den RANK-RANKL-OPG-Pathway eingreift. Nachdem bekannt wurde, dass Prostatakarzinome sehr heterogene ossäre Metastasen bilden, welche sowohl osteoblastische als auch osteolytische Komponenten aufweisen, wurde im Jahr 2001 von Zhang et al. publiziert, dass Prostatakrebszellen *in vitro* in der Lage sind, lösliches RANKL zu produzieren und für ihre Migration zu nutzen. Auch wurde in dieser Studie gezeigt, dass OPG, der lösliche Antikörper für RANKL, *in vitro* in der Lage ist, zu verhindern, dass sich Prostatakrebszellen im Milieu Knochen einnisten können. (Für ein anderes Mileu, nämlich das Subkutangewebe, konnte

dieser Effekt nicht gezeigt werden.) Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die Formung von Osteolysen angeregt durch den Einfluss von RANKL und inhibiert durch OPG einen elementaren Stellenwert für die ossäre Metastasierung des Prostatakarzinoms einnimmt und somit einen möglichen Ansatz für die Behandlung bzw. Verlangsamung des Wachstums von Knochenmetastasen darstellt. (Zhang et al. 2001; Roato et al. 2008)

Knapp zehn Jahre später wurde Denosumab (Handelsname XGEVA®), ein monoklonaler humaner Antikörper gegen RANKL, zur Prävention von skelettbezogenen Komplikationen (SRE) beim Vorliegen von Knochenmetastasen durch solide Tumoren zugelassen. (Neben der Zulassung für die Prävention der SRE gibt es den Wirkstoff Denosumab auch in niedriger Dosis mit dem Namen Prolia®, welches zur Behandlung von postmenopausaler Osteoporose zugelassen ist (Brown-Glaberman und Stopeck 2013).) Denosumab wirkt, indem es an RANKL bindet. Auf diese Weise wird die Wirkung vom natürlichen Antikörper OGP imitiert und RANK nicht aktiviert (Rucci und Angelucci 2014). Damit tritt es neben die bisherige alleinige Therapie der Bisphosphonate (Zoledronsäure) und stellt eine alternative Therapieoption dar. (Iqbal et al. 2011). Brown-Glaberman und Stopeck diskutieren in ihrem Review diverse Studien, welche die beiden Medikamente untereinander und mit Placebo vergleichen und fassen zusammen, dass Denosumab wegen eines anderen Nebenwirkungsprofils (unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für Hypokalziämie, Akute-Phase-Reaktion, Kieferosteonekrose, Nephrotoxizität (Saylor et al. 2013), BCG-itis und -organbefall) für eine bestimmte Gruppe von Patienten eine mindestens gleichwertige adäquate Alternative darstellt (z. B. Patienten mit Niereninsuffizienz, mit nephrotoxischen Medikamenten, mit Bisphosphonatenunverträglichkeit) (Brown-Glaberman und Stopeck 2013). Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch Iqbal et al., So et al., Gomez-Veiga et al. und Rucci und Angelucci (Iqbal et al. 2011; So et al. 2012; Gomez-Veiga et al. 2013; Rucci und Angelucci 2014). Fizazi et al. kommen in ihrer Phase III Studie sogar zu dem Ergebnis, Denosumab führe zu einer signifikant verlängerten Zeit bis zum Auftreten der ersten SRE als Zoledronsäure (Fizazi et al. 2011). Auch nach Smith et al. führt Denosumab in Patienten mit einem (kastrationsresistenten) Prostatakarzinom zu verzögerten SRE. Besonders hervorzuheben ist, dass es in dieser Studie zu einer verlängerten Zeit bis zum Auftreten der ersten Knochenmetastasen und einem verbesserten Knochenmetastasen-freien Überleben kam (Smith et al. 2012). Es gilt jedoch ebenfalls zu betonen, dass es für beide Medikationen – sowohl Denosumab als auch Zoledronsäure – ein spezifisches Nebenwirkungsprofil gibt, so dass die Entscheidung, welches Medikament Anwendung findet, im Idealfall eine angepasste, individuelle Entscheidung ist (So et al. 2012).

Maßgeblich ist also, dass für Denosumab in diversen Studien gezeigt werden konnte, dass es nicht nur zu einer Verzögerung von SRE führt, sondern zusätzlich zu einem signifikant verspäteten Auftreten von Metastasen bei noch nicht metastasierten Patienten mit Prostatakarzinom führen kann (Gomez-Veiga et al. 2013; Smith et al. 2012). Diese Verlängerung der Metastasen-freien Zeit ist zwar für das Gesamtüberleben noch nicht ausschlaggebend, hat jedoch dennoch im Hinblick auf die damit noch mehr verzögerten SRE eine hohe klinische Relevanz.

Mehrere Studien haben sich auch nach der Zulassung damit befasst, beide Medikamente, also Zoledronsäure und Denosumab, in ihrer Wirksamkeit mit Vor- und Nachteilen zu vergleichen, doch sie beschränken sich trotz der weiter gefassten Zulassung (auf solide Tumoren im allgemeinen) im Bereich der urogenitalen Karzinome auf die Vergleiche bei Anwendung am metastasierten Prostatakarzinom. Vergleichsweise viel Literatur ist noch über die Anwendung am Mamma-Ca zu finden, da hier der RANK-RANKL-OPG-Pathway nachgewiesen wurde und so dieselben Metastasierungswege diskutiert werden (Santini et al. 2011b; Schubert et al. 2008; Ney et al. 2012).

Eine Sonderstellung nimmt deshalb die Studie von Henry et al. ein, in welcher bewusst auf die Untersuchung von Denosumab und Bisphosphonaten im Prostatakarzinom und im Mamma-Ca verzichtet wurde (Henry et al. 2011). Untersucht wurden hier Patienten mit anderen soliden Karzinomen. Beinhaltet waren die Tumorentitäten kleinzelliges Bronchial-Ca, nicht-kleinzelliges Bronchial-Ca, Nierenzellkarzinom und Multiples Myelom. In dieser Phase III Studie zeigte sich eine leichte Überlegenheit von Denosumab gegenüber Zoledronsäure im Verzögern von SRE, auch wenn dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war. Das Gesamtüberleben und der Krankheitsprogress zeigten sich unter beiden Medikationen gleich (Henry et al. 2011).

Zu der Anwendung im Harnblasenkarzinom existiert ausgesprochen wenig Literatur, allerdings haben Froehner et al. erst im August 2014 eine Studie veröffentlicht, in welcher sie die Therapieschemata von Metastasen in mehreren urologischen Neoplasien vergleichen. Berichtet wurde über ein kleines Kollektiv von 40 Patienten mit Knochenmetastasen vom Harnblasenkarzinom, an welchen die Wirkung von Bisphosphonaten untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die behandelten Patienten ein signifikant längeres Zeitintervall ohne Auftreten von SRE aufwiesen und ein verbessertes Gesamtüberleben zeigten. Außerdem ließ sich eine deutliche Schmerzreduktion nachweisen. (Froehner et al. 2014; Zaghoul et al. 2010).

---

Betrachtet man nun die Ergebnisse dieser Studie im Vergleich zu den diskutierten Ergebnissen der aktuellen Therapieoptionen von Knochenmetastasen – insbesondere im Hinblick auf die veröffentlichten Ergebnisse der Therapie mit Zoledronsäure des Harnblasenkarzinoms mit Knochenmetastasen – so gibt dieses Grund zu der Annahme, dass genau diese Patienten mit einem ossär metastasierten Harnblasenkarzinom von einem Eingreifen in den RANK-RANKL-OPG-Pathway profitieren würden. Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie nicht eindeutig deckungsgleich mit den Ergebnissen von selbigen Untersuchungen beispielsweise am Prostatakarzinom (s. o.) sind, so ist doch besonders die erfolgreiche Therapie mit Bisphosphonaten an Patienten mit einem ossär-metastasierten Harnblasenkarzinom ein richtungsweisender Hinweis darauf (Froehner et al. 2014), dass Studien mit der Therapie von Denosumab ebenso erfolgversprechend sein könnten.

Vor allem vor dem Hintergrund, dass Patienten mit einem Harnblasenkarzinom häufig gleichzeitig an einer eingeschränkten Nierenfunktion leiden, wäre eine alternative nierenschonende Medikation neben Bisphosphonaten zur Behandlung von ossären Metastasen hilfreich. Diese Nierenfunktionsstörung liegt beispielsweise als Komorbidität bei fortgeschrittenem Alter der Patienten vor, ist bedingt durch vorangegangene Therapien mit nephrotoxischen Medikamenten (Maru et al. 2012) oder ist entstanden als Folge der künstlichen Harnableitung nach Zystektomie (z. B. durch ein Ileumconduit o. ä. (Gilbert et al. 2013)).

Wie oben bereits erläutert stellt Denosumab bei Patienten mit einem Prostatakarzinom und beispielsweise einer gleichzeitig eingeschränkten Nierenfunktion eine mindestens gleichwertige alternative Therapieoption zum Einsatz von Zoledronsäure dar, da hier keine Anpassung an die Nierenfunktion erforderlich ist (Brown-Glaberman und Stopeck 2013).

Die hier angeführten Beispiele für einen erfolgreichen Einsatz von Denosumab an anderen Tumorentitäten sowie die bereits erfolgreiche Anwendung von Zoledronsäure bei Patienten mit ossär metastasiertem Harnblasenkarzinom geben in Zusammenschau mit dieser Studie Grund zu der Annahme, dass auch ein medikamentöses Eingreifen in den RANK-RANKL-OPG-Pathway bei Patienten mit einem ossär metastasierten Harnblasenkarzinom erfolgreich sein könnte und gibt ferner Anlass dazu, weitere Studien anzuschließen.

---

### Kritische Betrachtung der durchgeführten Studie

Kritisch zu betrachten ist an der vorliegenden Studie das relativ kleine Kollektiv. Untersuchungen an kleinen Kollektiven können anfälliger für Störfaktoren sein und in ihrer Aussagekraft eingeschränkt sein. Im vorliegenden Kollektiv ist aufgrund der Verfügbarkeit unglücklicherweise die Invasionstiefe ‚pT1‘ nicht enthalten. Das Fehlen dieser Gruppe bedingt möglicherweise eine fehlende Aussage über die Entwicklung der Expressionen von nicht-invasiven zu invasiven Karzinomen und sollte in weiterführenden Studien korrigiert werden.

Auch die Tatsache, dass Knochenmetastasen in dieser Studie nicht gezielt untersucht wurden und daher nicht direkt mit dem Primärtumor zu vergleichen waren, macht eine Schlussfolgerung bzw. konkretere Aussage dieser Arbeit schwieriger.

Ebenfalls differenziert zu betrachten ist die Anwendung des Allred-Scores für die semiquantitative Analyse der Ergebnisse. Der Allred-Score stammt ursprünglich aus der Bewertung von Expressionen im Gewebe der Brustdrüse.

Der Sachverhalt, dass in dieser Studie keine Verlaufsbeobachtung der Patienten beinhaltet ist, erschwert es ebenfalls insgesamt, diese Ergebnisse mit den bisherigen Ergebnissen der Literatur eindeutig zu vergleichen. Daher empfehlen sich weitere Studien, welche den Nachweis der Expressionen von RANK, RANKL und OPG mit Kriterien, wie beispielsweise dem metastasenfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben, korrelieren.



## 6 Zusammenfassung und Ausblick

### 6.1 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom als häufige Krebserkrankung - vor allem beim Mann - stellt eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem dar. Auch für den Patienten ist es eine Erkrankung, die trotz voll ausgeschöpfter, vielseitiger Therapien häufig mit erheblichen Einschränkungen in der Lebensqualität verbunden ist und je nach Stadium bei Erstdiagnose sogar den zeitnahen Tod der Betroffenen bedingen kann. Besonders fortgeschrittene Erkrankungen im Sinne einer vorliegenden Metastasierung werden häufig erst durch die Verursachung von Beschwerden durch die Metastase selbst aufgedeckt und sind somit nur noch einer palliativen Therapie zugänglich. Marker, welche frühzeitig eingesetzt werden können, um Metastasen aufzudecken oder einen Krankheitsprogress anzuzeigen, sind bei der Erkrankung Harnblasenkarzinom wenig verfügbar. Ziel dieser Studie war es, mit einem möglichen Nachweis von RANK, RANKL und OPG im Harnblasenkarzinom eine Grundlage für einen solchen Marker zu erbringen, welcher sich im Falle eines positiven Nachweises im Verlauf auch als möglicher Ansatz für eine gezielte Therapie etablieren ließe. Für diese Studie wurde Tumorgewebe von Urothelkarzinomen der Harnblase von insgesamt 29 Patienten untersucht. Es wurden 40 histologische Schnittpräparate hergestellt, welche dann mittels Immunhistochemie angefärbt wurden. Die immunhistochemische Auswertung dieser Färbung erfolgte semiquantitativ unter Zuhilfenahme des Allred-Scores, die statistische Auswertung sowie die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Boxplots.

Als wesentlicher Kernaspekt lässt sich darstellen, dass in dieser Arbeit ein positiver Nachweis von RANK, RANKL und OPG im Harnblasenkarzinom gelungen ist. Dieses deckt sich in der Grundlage weitestgehend mit den Ergebnissen aus der Literatur bezüglich anderer Karzinomentitäten, wie beispielsweise des Prostatakarzinoms oder des Nierenzellkarzinoms.

Als weiterer wesentlicher Kernaspekt ist hervorzuheben, dass sich eine inverse Korrelation mit der Expression von RANKL und OPG im Verhältnis zur Invasivität zeigte. Das bedeutet, dass die Expressionen signifikant höher sind, je weniger invasiv das Karzinom zum Untersuchungszeitpunkt gewachsen ist und umgekehrt niedriger ist, je invasiver das Wachstum des Karzinoms voranschreitet. Diese Feststellung lässt sich möglicherweise damit erklären, dass das nicht-invasive Karzinom seine Migration und Metastasierung durch eine Nutzung des RANK-RANKL-OPG-Pathways vorbereitet und daher eine höhere RANKL-

Expression hervorbringt. Da OPG insgesamt niedriger exprimiert ist als RANKL, ergibt sich ein hohes RANKL:OPG-Verhältnis, welches Osteolysen fördert. Hierfür spricht ebenfalls, dass die RANKL-Expression im Bezug auf das Grading ebenfalls eine inverse Korrelation aufzeigt: Ein noch gut differenziertes G1-Karzinom exprimiert signifikant mehr RANKL als ein entdifferenziertes G3-Karzinom. Beide Ergebnisse zusammengefasst spiegeln eine erhöhte RANKL-Expression im wenig fortgeschrittenen Karzinom. In dieser Studie werden unter nicht-invasiven Karzinomen die Gruppe der pTa-Tumoren und unter invasiven Karzinomen die Gruppen pT2-pT4 zusammengefasst.

Eine Expression von RANK im Harnblasenkarzinom ist insgesamt vorhanden, zeigte aber keine Korrelation mit dem Staging oder mit dem Grading. Da RANK also auf der Oberfläche im nicht-invasiven wie auch im invasiven und im gut differenzierten wie auch im entdifferenzierten Karzinom vorkommt, lässt sich auch abschließend keine Aussage darüber treffen, ob oder in welchem Ausmaß eine Migration der Krebszellen von der RANK-Expression abhängt.

Wichtig ist, dass sich die Ergebnisse dieser Studie im Detail nicht vollständig mit bisherigen Ergebnissen aus der Literatur decken und somit nicht komplett mit bestehenden Theorien in Einklang zu bringen sind. Um den Stellenwert des RANK-RANKL-OPG-Pathway im Harnblasenkarzinom sowie dessen klinische Relevanz richtig und vollständig einschätzen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig sind. Abschließend ist festzuhalten, dass sich zu diesem Zeitpunkt noch keine sichere Aussage über die Relevanz von RANK, RANKL und OPG im Harnblasenkarzinom treffen lässt.

## 6.2 Ausblick

Aus der vorliegenden Studie ergeben sich vielfältige weitere Fragestellungen: Es wäre zum Beispiel möglich, eine Untersuchung *in vitro* an Zelllinien des Harnblasenkarzinoms durchzuführen. Diese wären dann auf die Expressionen der drei Proteine hin immunhistochemisch zu untersuchen. Auch könnte man in einem derartigen Studienmodell Karzinomzellen künstlich in ein ossäres Milieu einbringen, wie Zhang et al. es in ihrer Studie an Zelllinien des Prostatakarzinoms gezeigt haben und so herausfinden, wie abhängig eine mögliche Implantation von urothelialen Krebszellen in den Knochenstoffwechsel ist. So könnte dann ebenfalls gezielt der Effekt von OPG auf die Krebszelle des Urothels sowie dessen Migration nachgewiesen werden.

Karzinome der TNM-Klassifikation pT1 sind in dieser Studie nicht enthalten. Es wäre möglich, zusätzlich Tumoren der Gruppe pT1 zu untersuchen, um so hervorzuheben, an welchem Punkt der Invasivität die Expression von RANKL nachlässt und möglicherweise an Notwendigkeit verliert. Dieses wäre aus dem Grund von besonderem Interesse, weil die pT1-Tumoren zwar nicht mehr nur oberflächlich wachsen, aber in die Muskulatur noch nicht infiltrativ eingewachsen sind und somit eine gewisse intermediäre Stellung einnehmen.

Außerdem wäre es möglich, eine Studie wie die vorliegende insgesamt mit einem größeren Kollektiv durchzuführen, um so den Einfluss möglicher Störvariablen zu reduzieren. Auch wäre es denkbar, eine gezielte Untersuchung an Karzinomen und deren Metastasen durchzuführen, wie dieses von Santini et al. bereits ähnlich durchgeführt worden ist. Hier könnte der Schwerpunkt auf den direkten Vergleich der Ergebnisse zwischen Primärtumor und zugehöriger ossärer Metastase gelegt werden, um einen möglichen Zusammenhang aufzudecken.

Neben *in vitro*-Untersuchungen und Versuchen an einem größeren Kollektiv ergibt sich aus dieser Arbeit auch die Fragestellung, ob RANKL – aufgrund seiner frühen hohen Expression – als Marker geeignet wäre, den Krankheitsverlauf bzw. die spätere Invasion des Karzinoms vorherzusagen. Hierfür wäre es notwendig, immunhistochemische Untersuchungen im zeitlichen Verlauf durchzuführen und zu untersuchen, ob beispielsweise pTa-Karzinome mit einer zu Beginn deutlich höheren Expression von RANKL anschließend im Verlauf vermehrt infiltrierend wachsen. Parallel dazu könnte sich eine Untersuchung und mögliche Etablierung der Serumwerte für die drei Marker anbieten.

Zuletzt ist es denkbar, dass man klinische Studien mit der therapeutischen Anwendung des RANKL-Antikörpers Denosumab durchführt. Es hat sich bisher an anderen Tumorentitäten gezeigt, dass ein Einsatz von Denosumab mindestens vergleichbar erfolgreich ist wie der Einsatz von Zoledronsäure zur Verzögerung von SRE bei bestehenden Knochenmetastasen. Da es einzelne erfolgreiche Nachweise der Wirksamkeit von Zoledronsäure an Patienten mit einem ossär metastasierten Harnblasenkarzinom gibt (Froehner et al. 2014), wäre es durchaus vorstellbar, dass die Therapie mit Denosumab ähnlich erfolgreich ist.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellen

<b>TNM-Stadium</b>	<b>Erklärung</b>
Ta	Nichtinvasives papilläres Urothelkarzinom
Cis	Carcinoma in situ
T1	Infiltration der Lamina propria T1a – oberhalb der Muscularis mucosae T1b – innerhalb/unterhalb der Muscularis mucosae
T2	Infiltration der Muscularis propria T2a – innere Hälfte T2b – äußere Hälfte
T3	Infiltration des perivesikalen Fettgewebes T3a – mikroskopisch erkennbar T3b – makroskopisch erkennbar
T4	Infiltration anderer Organe T4a – Prostata, Uterus oder Vagina T4b – Becken- oder Bauchwand
N0	Kein Lymphknoten befallen
N1-3	N1 – Befall eines Lymphknotens, max. 2 cm durchmessend N2 – Befall eines Lymphknotens; 2,1-5 cm od. multiple Lymphknotenmetastasen <5 cm N3 – Lymphknotenmetastasen >5 cm
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden
L0	Keine Lymphgefäßinvasion
L1	Lymphgefäßinvasion
V0	Keine Blutgefäßinvasion
V1	Blutgefäßinvasion
R0	Keine Tumorreste erkennbar
R1-2	R1 – nur mikroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation R2 – auch makroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation, Metastasen

TNM-Stadium	Erklärung
Zusätze	<p>pT/N/M – durch pathologische Untersuchung festgestellt</p> <p>cT/N/M – durch klinische / radiologische Untersuchung festgestellt</p> <p>yT/N/M – Staging nach Chemo oder Bestrahlung</p> <p>rT/N/M – Rezidiv</p>

**Tabelle 7-1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms**

Die Tabelle erläutert den Ausbreitungsgrad des Harnblasenkarzinoms (Staging) gemäß der einheitlichen TNM-Klassifikation. Die TNM-Klassifikation beinhaltet sowohl die Invasionstiefe als auch den Befall von Lymphknoten, Lymphgefäßen, Blutgefäßen sowie das Vorliegen von Fernmetastasen. Zusätzlich gibt die Einteilung Auskunft darüber, ob postoperativ Reste des Tumors vorhanden sind. Die Tabelle ist modifiziert nach Hautmann (2010) und Lindemann-Docter und Knüchel (2008) und Hiddemann und Bartram (2010) und Lindemann-Docter und Knüchel-Clarke (2008) und Cheng et al. (2009).

WHO 2004	WHO 1973
Normales Urothel	(„Leichte Dysplasie“)
Urotheliale Hyperplasie	
Reaktive Atypie	
Atypie mit unklarer Bedeutung	
Urotheliale Dysplasie (intraurotheliale Neoplasie low grade (= IUN LG))	Mittlere Dysplasie
Carcinoma in situ (intraurotheliale Neoplasie high grade (= IUN HG))	Mittlere Dysplasie
	Schwere Dysplasie
	Carcinoma in situ (G1-G3)
Papillom	Papillom
Papilläre urothelialer Neoplasie low malignant potential (= PUNLMP)	pTa G1
pTa low grade	pTa G1
	pTa G2
pTa high grade	pTa G2
	pTa G3
pT1-4 low grade	pT1-4 G1
	pT1-4 G2
pT1-4 high grade	pT1-4 G2
	pT1-4 G3

**Tabelle 7-2: Gegenüberstellung der WHO-Klassifikation von 2004 und 1973**

In dieser Tabelle werden die Klassifikationen, welche von der WHO 1973 erstellt worden sind und 2004 aktualisiert wurden, einander gegenüber gestellt. Entscheidend ist, dass einige der früheren Entitäten detaillierter aufgespaltet wurden, aber auch gleichzeitig andere Entitäten der alten Klassifikation in der neuen zusammengefasst wurden. Diese Überarbeitung erfolgte mit dem Ziel, weltweit einheitliche Nomenklaturen für die Praxis anwendbar zu gestalten. Die Tabelle ist modifiziert und ergänzt nach Seitz et al. (2005) und Lindemann-Docter und Knüchel (2008).

Histol. Bezeichnung	Beschreibung
<b>Nicht-invasive Urothelneoplasien, flache Läsionen</b>	
Hyperplasie	Eine Hyperplasie zeichnet sich durch ein verbreitertes Epithel aus, ohne dass gleichzeitig Zellatypien vorhanden sind. Hierbei handelt es sich nicht um eine (obligate) Präkanzerose, obgleich sich die vorhandenen genetischen Veränderungen in parallel vorkommenden oder später auftretenden Karzinomen der Harnblase zeigen können.
Reaktive Atypie	Einer reaktiven Atypie liegen als Ursache Entzündungen der Harnblase oder der Zustand nach Therapie einer solchen Entzündung zu Grunde. Das morphologische Korrelat sind Atypien im Urothel sowie eine leichte Störung des regelhaften Schichtaufbaus. Es dürfen jedoch keine Unregelmäßigkeiten in der Chromatinverteilung und keine Hyperchromasien der Kerne vorhanden sein. Wenn trotz klinischen Angaben unklar bleibt, ob es sich um eine reaktive Atypie oder um eine Neoplasie handelt, dienen möglicherweise immunhistochemische Untersuchungen als diagnostische Hilfsmittel.
Dysplasie (IUN LG)	Die Dysplasie (=intraurotheliale Neoplasie low-grade) nimmt eine intermediäre Stellung zwischen einer Atypie (s. o.) ohne adäquate Entzündungsreaktion und eines Cis (s. u.) ein und ist deshalb auch als präneoplastische Veränderung zu bezeichnen. Innerhalb dieser veränderten Zellen gibt es bereits genetische Veränderungen. Da diese Art der Veränderung gehäuft bei Patienten mit einem manifesten Urothelkarzinom vorkommt und gleichzeitig eine Vorstufe des Cis darstellt, sollte diese Diagnose zu einer engmaschigeren Kontrolle führen. Die Dysplasie low-grade entspricht den Dysplasien G1 und anteilig G2 nach alter Klassifikation.
Carcinoma in situ (IUN HG)	Das Carcinoma in situ entspricht einer intraurothelialen Neoplasie high-grade. Ein Cis liegt vor, wenn im Urothel massiv atypische Zellen vorliegen. Eine erhaltene Schichtung des Urothels ist dabei möglich. In knapp 50 % liegt das Cis gleichzeitig in Kombination mit einem invasiven Karzinom vor, in bis zu 80 % geht es in ein

Histol. Bezeichnung	Beschreibung
	invasives Karzinom über. Aus diesem Grund ist das Cis als obligate Präkanzerose zu bezeichnen. Das Cis entspricht einer Dysplasie G3 und anteilig auch eine Dysplasie G2 (=HG) nach alter Klassifikation.
<b>Nicht-invasive Urothelneoplasien, papilläre Neoplasien</b>	
Papillom	Bei einem Papillom handelt es sich um eine Neubildung des Urothels, bei welcher keine Atypie und keine Schichtveränderung im Sinne einer Verbreiterung des Urothels auftreten. Diese Art der Neoplasie kann sogar bereits bei Kindern vorkommen und transformiert nicht in ein Karzinom.
Papilläre urotheliale Neoplasie „low malignant potential“ (PUNLMP)	<p>Die Diagnosestellung eines PUNLMP erfordert streng das Vorliegen bestimmter Morphologien: Hierbei ist das Urothel als verbreitert zu beschreiben, ohne jedoch das Vorliegen von Störungen in der Polarisation. Zellkernatypien dürfen nicht vorliegen, wobei eine Vergrößerung der Kerne durchaus möglich ist. Im Gesamtbild erscheint das PUNLMP strukturiert und einheitlich. Es liegt i. d. R. kein invasives Wachstum und keine Metastasierung vor.</p> <p>Die Therapie erfolgt mittels Abtragung – postoperativ rezidivieren etwa 35 %. Zu einer malignen Transformation in ein Urothelkarzinom kommt es in etwa 4 % der Fälle. Sie entsprechen einem Anteil der vormals als pTa G1 bezeichneten Veränderungen.</p>
Nicht-invasive papilläre Harnblasenkarzinome (pTa – low grade + high grade)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pTa – low grade: Bei den pTa-Tumoren gibt es zwar insgesamt noch ein geordnetes Bild, aber gleichzeitig gibt es eine Architekturstörung und leichte Zellatypien. Es rezidivieren etwa 50-70 %, bei weniger als 12 % ist ein Progress in ein Urothelkarzinom gegeben. Mit 5 % ist die Mortalität noch eher gering. Sie entsprechen einem Teil, der vormals als pTa G1 und einem Teil, der vormals als pTa G2 bezeichneten Tumoren.</li> <li>- pTa – high grade: Diese pTa-Tumoren haben eine massive Architekturstörung sowie zahlreiche Kernatypien. In 70-75 % kommt es zu einem Rezidiv, bei 15-40 % kommt es zu einem Progress. Die Mortalitätsrate ist mit 20 % bereits</li> </ul>



Histol. Bezeichnung	Beschreibung
	<p>deutlich höher als die der pTa - low grade – Tumoren. High-grade entspricht der ehemaligen Gruppe pTa G3 und anteilig pTa G2.</p> <p>(Die Zuordnung zu der Gruppe low-grade oder high-grade erfolgt orientiert an dem Gewebe mit der geringsten Differenzierung.)</p>
<b>Invasive Urothelneoplasien</b>	
<p>Invasive Urothelkarzinome</p>	<p>Ein invasives Urothelkarzinom zeichnet sich durch die Infiltration der Lamina propria aus und ist potentiell metastasierungsfähig. Histologisch stellt es sich als sehr heterogen dar, man unterscheidet high grade (HG) versus low grade (LG) bei unterschiedlicher Infiltrationstiefe (pT1 (nicht-invasiv) - pT4 (muskelinvasiv)). Ob das Karzinom rezidiert oder einen progredienten Verlauf nimmt, hängt von Faktoren wie zum Beispiel der Tumorgroße (&gt;3 cm), der Multifokalität und dem begleitenden Vorliegen eines Cis ab. Als wichtiger prognostischer Faktor stellt sich die Infiltrationstiefe dar.</p> <p>Eine besonders schlechte Prognose haben pT4-Karzinome, metastasierte Karzinome (N1/M1) und Karzinome, welche die Ureterostien betreffen.</p>

**Tabelle 7-3: Histologische Pathologien urothelialer Veränderungen nicht-invasiver und invasiver Genese**

Die Tabelle erläutert sowohl die für diese Arbeit relevanten sowie der Vollständigkeit halber auch die weiteren von der WHO vergebenen Entitäten der invasiven und nicht-invasiven urothelialen Veränderungen (Lindemann-Docter und Knüchel 2008; Seitz et al. 2005). Es wird sich an dieser Stelle ausschließlich auf Neoplasien vom Urothel beschränkt, da in dieser Studie ebenfalls nur Tumoren vom Urothel-Typ untersucht worden sind. Inhaltlich ist die Tabelle aus Lindemann-Docter und Knüchel (2008) und Seitz et al. (2005).

Lokalisation	Häufigkeit [%]
Leber	48
Lunge	45
Skelettsystem	33

**Tabelle 7-4: Häufigkeit und Lokalisierung der Fernmetastasierung beim Urothelkarzinom**

Diese Tabelle nach Wallmeroth et al. (1999) zeigt das prozentuale Vorkommen der Fernmetastasierung in die Lokalisierungen Leber, Lunge und Skelettsystem (aus Hiddemann und Bartram 2010).

Grad	Differenzierung	Häufigkeit	Infiltration	Metastasierung
G1	hoch differenziert	25 %	19 %	< 10 %
G2	mäßig differenziert	50 %	40-60 %	30 %
G3	gering differenziert	25 %	80-90 %	80 %

**Tabelle 7-5: Differenzierungsgrade und Infiltration / Metastasierung**

Abhängig von den Differenzierungsgraden G1-G3 der Urothelkarzinome ist mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass eine Infiltration in umliegendes Gewebe vorliegt und eine Fernmetastasierung stattfindet. Die unterschiedlichen Differenzierungsgrade selbst kommen mit einer bestimmten Häufigkeit vor (Berger et al. 2010).

---

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
i. d. R.	in der Regel
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
$\kappa$	Kappa
o. g.	oben genannt
OPG	<i>osteoprotegerin</i>
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>B-ligand</i>
sog.	sogenannt
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TUR	transurethrale Resektion
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

---

## 8.2 Literaturverzeichnis

Alcaraz A, González-López R, Morote J, La Piedra C de, Meseguer C, Esteban E, Climent M, González-Gragera B, Alvarez-Ossorio J, Chirivella I et al. (2013): Biochemical markers of bone turnover and clinical outcome in patients with renal cell and bladder carcinoma with bone metastases following treatment with zoledronic acid: The TUGAMO study. *Br J Cancer* 109, 121–130

Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC (2008): RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* 68, 92–104

Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R: *Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie*. 4. Auflage; ecomed Medizin, Heidelberg 2010

Boyce BF, Xing L (2007): Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 9 (Suppl. 1), S1

Boyce BF, Xing L (2008): Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473, 139–146

Brown-Glaberman U, Stopeck AT (2013): Impact of denosumab on bone mass in cancer patients. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* 5, 117–129

Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA (2006): Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 107, 289–298

Chen H, Su C, Hsieh H, Tung C, Hsu C, Wang Y, Shen C (2014): Clinical Significance of Survivin Expression in Patients with Urothelial Carcinoma. *Disease Markers* 2014, 1–7

Cheng L, Montironi R, Davidson DD, Lopez-Beltran A (2009): Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol* 22, S70-95

Cole P, Hoover R, Friedell GH (1972): Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer* 29, 1250–1260

Corey E, Brown LG, Kiefer JA, Quinn JE, Pitts TEM, Blair JM, Vessella RL (2005): Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 65, 1710–1718

- Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, Brabbs AC, van Beek EJ, Holen I, Skerry TM et al. (2001): Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 98, 3534–3540
- Daltoé RD, Madeira KP, Carvalho AA de, Rezende LCD de, Silva IV, Rangel LBA (2014): Evaluation of the progesterone receptor status in breast cancer using three different antibodies: a comparison by Allred score system. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 331–339
- Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damiao R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H et al. (2011): Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 377, 813–822
- Froehner M, Hölscher T, Hakenberg OW, Wirth MP (2014): Treatment of Bone Metastases in Urologic Malignancies. *Urol Int* 93, 1–8
- Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, Shen Z, Patel N, Tai Y, Chauhan D et al. (2009): Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood* 114, 371–379
- Gilbert SM, Lai J, Saigal CS, Gore JL (2013): Downstream Complications Following Urinary Diversion. *The Journal of Urology* 190, 916–922
- Gomez-Veiga F, Ponce-Reixa J, Martinez-Breijo S, Planas J, Morote J (2013): Advances in prevention and treatment of bone metastases in prostate cancer. Role of RANK/RANKL inhibition. *Actas Urol Esp* 37, 292–304
- Hautmann R: *Urologie (Springer-Lehrbuch)*. 4., überarbeitete und aktualisierte Auflage; Springer, Heidelberg 2010
- Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, Scagliotti GV, Sleeboom H, Spencer A, Vadhan-Raj S et al. (2011): Randomized, Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid in the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Cancer (Excluding Breast and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 29, 1125–1132
- Hiddemann W, Bartram CR: *Die Onkologie*. 2. Auflage; Springer Medizin, Berlin 2010
- Iqbal J, Sun L, Mechanick JI, Zaidi M (2011): Anti-cancer actions of denosumab. *Curr Osteoporos Rep* 9, 173–176

- Jung K, Stephan C, Semjonow A, Lein M, Schnorr D, Loening SA (2003): Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand as indicators of disturbed osteoclastogenesis in patients with prostate cancer. *J Urol* 170, 2302–2305
- Lehmann J, Suttman H, Albers P, Volkmer B, Gschwend J, Fechner G, Spahn M, Heidenreich A, Odenthal A, Seif C et al. (2009): Metastasen Chirurgie in kurativer Absicht beim Urothelkarzinom. *Urologe* 48, 143–150
- Lindemann-Docter K, Knüchel R (2008): Update on urothelial carcinoma histopathology. *Pathologe* 29, 331–338
- Lindemann-Docter K, Knüchel-Clarke R (2008): Histopathologie des Harnblasenkarzinoms. *Urologe* 47, 627–638
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2006
- Maru S, Abe T, Shinohara N, Sazawa A, Maruyama S, Harabayashi T, Suzuki S, Nonomura K (2012): Influence of baseline renal function and dose reduction of nephrotoxic chemotherapeutic agents on the outcome of metastatic urothelial carcinoma: A retrospective study. *International Journal of Urology* 19, 110–116
- Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, Mochizuki S, Ikeda T, Mukai M, Okada Y (2009): Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J Pathol* 218, 530–539
- Mori K, Le Goff B, Charrier C, Battaglia S, Heymann D, Rédini F (2007): DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFκB: New insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone* 40, 981–990
- Ney J, Fehm T, Juhasz-Boess I, Solomayer E (2012): RANK, RANKL and OPG Expression in Breast Cancer - Influence on Osseous Metastasis. *Geburtsh Frauenheilk* 72, 385–391
- Okamura T, Akita H, Tatsura H, Kawai N, Nagata D, Azemoto M, Iwase Y, Kohri K (2003): The efficacy of a serum carboxyterminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen as a quantitative screening marker for bone metastases in patients with urological malignancies. *Cancer Detection and Prevention* 27, 14–18
- Raju R, Balakrishnan L, Nanjappa V, Bhattacharjee M, Getnet D, Muthusamy B, Kurian Thomas J, Sharma J, Rahiman BA, Harsha HC et al. (2011): A comprehensive manually curated reaction map of RANKL/RANK-signaling pathway. *Database (Oxford)* 2011, bar021

---

Roato I, D'Amelio P, Gorassini E, Grimaldi A, Bonello L, Fiori C, Delsedime L, Tizzani A, Libero A de, Isaia G et al. (2008): Osteoclasts are active in bone forming metastases of prostate cancer patients. *PLoS One* 3, e3627

Robert Koch-Institut: Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes); Robert Koch-Institut, Berlin 2010

Robert Koch-Institut: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 9. Auflage; Robert Koch-Institut, Berlin 2013

Rokita M, Stec R, Bodnar L, Charkiewicz R, Korniluk J, Smoter M, Cichowicz M, Chyczewski L, Nikliński J, Kozłowski W et al. (2013): Overexpression of epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in colorectal cancer on the basis of the Allred scoring system. *OTT*, 967-976

Rübben H: Uroonkologie. 4. Auflage; Springer Medizin, Heidelberg 2007

Rucci N, Angelucci A (2014): Prostate Cancer and Bone: The Elective Affinities. *BioMed Research International* 2014, 1–14

Santini D, Perrone G, Roato I, Godio L, Pantano F, Grasso D, Russo A, Vincenzi B, Fratto ME, Sabbatini R et al. (2011a): Expression pattern of receptor activator of NFkappaB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *J Cell Physiol* 226, 780–784

Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, Gaeta L, Pantano F, Russo A, Ortega C, Porta C, Galluzzo S, Armento G et al. (2011b): Receptor activator of NF-kB (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* 6, e19234

Saylor PJ, Armstrong AJ, Fizazi K, Freedland S, Saad F, Smith MR, Tombal B, Pienta K (2013): New and emerging therapies for bone metastases in genitourinary cancers. *Eur Urol* 63, 309–320

Schubert A, Schulz H, Emons G, Gründker C (2008): Expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) in HCC70 breast cancer cells and

effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone on RANKL expression. *Gynecol Endocrinol* 24, 331–338

Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C (2005): Harnblasentumoren: Die neue WHO-Klassifikation 2004. *Urologe* 44, 1073–1086

Silva I, Branco JC (2011): RANK/RANKL/OPG: literature review. *Acta Reumatol Port* 36, 209–218

Smith MR, Saad F, Coleman R, Shore N, Fizazi K, Tombal B, Miller K, Sieber P, Karsh L, Damiao R et al. (2012): Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 379, 39–46

So A, Chin J, Fleshner N, Saad F (2012): Management of skeletal-related events in patients with advanced prostate cancer and bone metastases: Incorporating new agents into clinical practice. *Can Urol Assoc J* 6, 465–470

Sökeland J, Schulze H, Rübber H: *Urologie*. 13. Auflage; Thieme, Stuttgart 2004

Tabata K, Matsumoto K, Minami S, Ishii D, Nishi M, Fujita T, Saegusa M, Sato Y, Iwamura M, Woloschak GE (2014): Nestin Is an Independent Predictor of Cancer-Specific Survival after Radical Cystectomy in Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder. *PLoS ONE* 9, e91548

Taher AN, Kotb MH (2006): Bone metastases in muscle-invasive bladder cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* 18, 203–208

Todenhöfer T, Hennenlotter J, Schmiedel BJ, Hohneder A, Grimm S, Kühs U, Salih HR, Bühring H, Fehm T, Gakis G et al. (2013): Alterations of the RANKL pathway in blood and bone marrow samples of prostate cancer patients without bone metastases. *Prostate* 73, 162–168

Tsumura H, Matsumoto K, Sato Y, Ikeda M, Fujita T, Satoh T, Iwamura M (2013): Abnormal expression of multiple proteins predicts cancer-specific mortality in patients with high-grade non-muscle-invasive bladder cancer treated with transurethral resection. *Mol Clin Oncol* 1, 473–479

Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K (2007): CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4514–4521



Wynder EL, Stellman SD (1977): Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. *Cancer Res.* 37, 4608–4622

Yamada T, Tsuda M, Takahashi T, Totsuka Y, Shindoh M, Ohba Y (2011): RANKL expression specifically observed in vivo promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. *Am J Pathol* 178, 2845–2856

Yıldırım A, Kösem M, Sayar I, Gelincik I, Yavuz A, Bozkurt A, Erkorkmaz U, Bayram I (2014): Relationship of PCNA, C-erbB2 and CD44s expression with tumor grade and stage in urothelial carcinomas of the bladder. *Int J Clin Exp Med* 7, 1516–1523

Zafeirakis A (2010): Collagenous and non-collagenous biochemical markers of bone metastases from prostate cancer. *Hippokratia* 14, 164–169

Zaghloul MS, Boutrus R, El-Hossieny H, Kader YA, El-Attar I, Nazmy M (2010): A prospective, randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in bony metastatic bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 15, 382–389

Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin D, Smith P, Strayhorn C, Mizokami A, Fu Z, Westman J, Keller ET (2001): Osteoprotegerin inhibits prostate cancer–induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 107, 1235–1244

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Relevante genetische Veränderung bei der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms .....	5 -
Abbildung 1-2: Verständigungsmechanismus im Knochenstoffwechsel .....	13 -
Abbildung 1-3: Biochemische Signaltransduktion im Detail.....	14 -
Abbildung 4-1: Antikörper RANK, pTa, Vergrößerung 100x .....	26 -
Abbildung 4-2: Antikörper RANK, pTa, Vergrößerung 200x .....	26 -
Abbildung 4-3: Antikörper RANK, pT4, Vergrößerung 100x .....	27 -
Abbildung 4-4: Antikörper RANK, pT4, Vergrößerung 200x .....	27 -
Abbildung 4-5: Antikörper RANK, gesundes Urothel, Vergrößerung 100x.....	28 -
Abbildung 4-6: Antikörper RANKL, pTa, Vergrößerung 100x.....	29 -
Abbildung 4-7: Antikörper RANKL, pTa, Vergrößerung 200x.....	29 -
Abbildung 4-8: Antikörper RANKL, pT4, Vergrößerung 100x .....	30 -
Abbildung 4-9: Antikörper RANKL, pT4, Vergrößerung 200x .....	30 -
Abbildung 4-10: Antikörper RANKL, gesundes Urothel, Vergrößerung 100x .....	31 -
Abbildung 4-11: Antikörper OPG, pTa, Vergrößerung 100x .....	32 -
Abbildung 4-12: Antikörper OPG, pTa, Vergrößerung 200x .....	32 -
Abbildung 4-13: Antikörper OPG, pT4, Vergrößerung 100x .....	33 -
Abbildung 4-14: Antikörper OPG, pT4, Vergrößerung 200x .....	33 -
Abbildung 4-15: Antikörper OPG, gesundes Urothel, Vergrößerung 100x .....	34 -
Abbildung 4-16: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach TNM .....	37 -
Abbildung 4-17: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Invasivität (1).....	39 -
Abbildung 4-18: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Invasivität (2).....	40 -
Abbildung 4-19: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Invasivität (3).....	41 -
Abbildung 4-20: Boxplot für die Expression von RANK, gruppiert nach Grading (G1, G2, G3).....	42 -
Abbildung 4-21: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach TNM.....	45 -
Abbildung 4-22: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Invasivität (1) .....	47 -
Abbildung 4-23: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Invasivität (2) .....	48 -
Abbildung 4-24: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Invasivität (3) .....	49 -
Abbildung 4-25: Boxplot für die Expression von RANKL, gruppiert nach Grading (G1, G2, G3) .....	50 -
Abbildung 4-26: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach TNM.....	53 -
Abbildung 4-27: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Invasivität (1) .....	54 -
Abbildung 4-28: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Invasivität (2) .....	55 -
Abbildung 4-29: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Invasivität (3) .....	56 -
Abbildung 4-30: Boxplot für die Expression von OPG, gruppiert nach Grading (G1, G2, G3) .....	57 -

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Das Patientenkollektiv .....	- 19 -
Tabelle 3-2: Immunhistochemie der Antikörper .....	- 21 -
Tabelle 3-3: Allred-Score zur Quantifizierung der Zellsignale .....	- 22 -
Tabelle 4-1: Datenstammbblatt .....	- 25 -
Tabelle 4-2: Verteilung der unterschiedlichen Färbungsintensitätsgrade nach dem Allred-Score im Gesamtkollektiv für RANK, RANKL und OPG .....	- 35 -
Tabelle 4-3: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der TNM-Klassifikation .....	- 38 -
Tabelle 4-4: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der Invasivität (1) .....	- 39 -
Tabelle 4-5: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der Invasivität (2); .....	- 40 -
Tabelle 4-6: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit der Invasivität (3) .....	- 41 -
Tabelle 4-7: Verteilung der Expression von RANK, korreliert mit dem Grading .....	- 42 -
Tabelle 4-8: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der TNM-Klassifikation .....	- 46 -
Tabelle 4-9: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der Invasivität (1) .....	- 47 -
Tabelle 4-10: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der Invasivität (2) .....	- 48 -
Tabelle 4-11: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit der Invasivität (3) .....	- 49 -
Tabelle 4-12: Verteilung der Expression von RANKL, korreliert mit dem Grading .....	- 50 -
Tabelle 4-13: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der TNM-Klassifikation .....	- 53 -
Tabelle 4-14: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der Invasivität (1) .....	- 54 -
Tabelle 4-15: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der Invasivität (2) .....	- 55 -
Tabelle 4-16: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit der Invasivität (3) .....	- 56 -
Tabelle 4-17: Verteilung der Expression von OPG, korreliert mit dem Grading .....	- 57 -
Tabelle 7-1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms .....	- 81 -
Tabelle 7-2: Gegenüberstellung der WHO-Klassifikation von 2004 und 1973 .....	- 82 -
Tabelle 7-3: Histologische Pathologien urothelialer Veränderungen nicht-invasiver und invasiver Genese .....	- 85 -
Tabelle 7-4: Häufigkeit und Lokalisierung der Fernmetastasierung beim Urothelkarzinom .....	- 86 -
Tabelle 7-5: Differenzierungsgrade und Infiltration / Metastasierung .....	- 86 -

## DANKSAGUNG

An alle Unterstützenden und Teilhabenden möchte ich meinen Dank aussprechen.

An erster und wichtigster Stelle möchte ich mich bei Dr. med. A. Strauss für die zuverlässige und engagierte Betreuung bedanken. Mein herzlichster Dank gilt ihm auch für die hilfreiche Kritik und die Beurteilungen zu jeder Zeit sowie für die beständige Unterstützung. Nicht zuletzt danke ich ihm auch für die freundliche Überlassung des Themas, die Strukturierungen dessen sowie für seine Offenheit gegenüber neuen Ideen, so dass das Thema schließlich zu der Arbeit werden konnte, die sie jetzt ist.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. L. Trojan. Außerdem möchte ich Dr. med. C.-L. Behnes und der Abteilung für Pathologie (Universitätsmedizin Göttingen) danken für die freundliche Unterstützung während der Entwicklung dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und mir mit vielen guten Ratschlägen sehr geholfen haben.