

Urologe 2019 · 58:760–767

<https://doi.org/10.1007/s00120-019-0967-5>

Online publiziert: 6. Juni 2019

© Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature 2019



M. C. Hupe¹ · G. Gakis² · R. Seiler³

¹Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland

²Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, Deutschland

³Departement für Urologie, Inselspital Bern, Bern, Schweiz

Molekulares Tumorboard – Urothelkarzinom

Molekulare Tumorboards (MTB) finden immer mehr Einzug in den klinischen Alltag. Mittels molekularen Analysen und anschließenden Tumorboardbeschlüssen können immer mehr Patienten mit onkologischen Erkrankungen gezielter therapiert werden. Die molekulare Landschaft des Urothelkarzinoms ist sehr heterogen, wodurch die Entwicklung zielgerichteter Therapien erschwert ist. Neben dem Therapieansprechen und der Prognose interessieren beim Urothelkarzinom jedoch auch die Vorhersage des „wahren“ Krankheitsstadiums (T, N und M), da die prätherapeutische Bildgebung häufig nur unzureichend ist.

In Deutschland erkranken jährlich ca. 12.000 Männer und ca. 4000 Frauen am Urothelkarzinom der Harnblase [10]. Ungefähr 10–15% aller Patienten haben bereits bei Erstdiagnose ein metastasiertes Urothelkarzinom [26]. In den EAU-Leitlinien (European Association of Urology) sind aktuell 3 systemische Therapieregimes beim metastasierten Urothelkarzinom empfohlen: Cisplatin-basierte Chemotherapie, PD-(L)1-Inhibitoren („programmed cell death [ligand] 1“, Pembrolizumab/Atezolizumab/Nivolumab) oder Vinflunin [34]. Trotz Neuerungen im Therapiemanagement des Urothelkarzinoms, wie z. B. die neoadjuvante Chemotherapie (NAC) vor radikaler Zystektomie, hat sich die Prognose von Urothelkarzinompatienten nur unwesentlich verbessert [20].

Während für andere Krebsentitäten die zielgerichtete Therapie bei nachgewiesenen molekularen Alterationen bereits zum Repertoire der Systemtherapie gehört, so z. B. für die chronisch myeloische Leukämie (CML; BCR-ABL), das Melanom (BRAF) oder das nichtkleinzellige Lungenkarzinom (NSCL; ALK; [15]), beruhen die Therapieentscheidungen für das Urothelkarzinom weiter hauptsächlich auf dem Staging und Grading [20]. Nur für die Erstliniensystemtherapie bei Cisplatin-unfiten Patienten mit Atezolizumab/Pembrolizumab ist mit der PD-L1-Bestimmung seit Neuestem ein Markertest notwendig [34].

» MTB bieten Patienten die Möglichkeit, unmittelbar von der „Cutting-edge-Wissenschaft“ zu profitieren

Auch beim Urothelkarzinom konnten bereits viele weitere molekulare Alterationen (u. a. des Zellzyklus, des Apoptose-signalwegs oder der Angiogenese) und somit potentielle Biomarker identifiziert werden. Jedoch verhinderte bis dato das Fehlen unabhängiger prospektiver Validierungsstudien eine erfolgreiche Implementierung dieser Biomarker in den klinischen Alltag [20].

Viele onkologische Patienten erfahren einen Krankheitsprogress über die zugelassenen und leitlinienempfohlenen Therapieoptionen hinaus. MTB bieten diesen Patienten die Möglichkeit, unmittelbar von der „Cutting-edge-Wissenschaft“, d. h. von der direkten Translati-

on von Ergebnissen der Grundlagenforschung in die klinische Praxis, im Sinne einer hochindividualisierten Therapie zu profitieren. Die in den MTB empfohlenen zielgerichteten Therapien können den Patienten entweder im Rahmen klinischer Studien, einer „Off-label-Therapie“ oder eines Härtefallprogramms zugänglich gemacht werden [15].

Neben den „klassischen“ Tumorboards aufgetrennt nach Fachgebieten (Urologie, Gynäkologie usw.) werden nun zunehmend derartige interdisziplinären MTB an großen Kliniken etabliert. Es gibt bereits erste publizierte Erfahrungsberichte zur Implementierung von MTB an großen onkologischen Zentren, die wichtige Kennzahlen und auch Limitationen verdeutlichen.

Bryce et al. [4] beschreiben ihre ersten Erfahrungen aus der Mayo Clinic, USA, an der zwischen 2012 und 2015 165 Patienten zum dortigen MTB angemeldet wurden. Hiervon waren lediglich 3 Patienten mit einer Blasenkarzinom-erkrankung. In 141 Fällen wurde eine mole-

Abkürzungen

CSS	Krebsspezifisches Überleben
LK	Lymphknoten
MIBC	Muskelinvasives Blasenkarzinom
MTB	Molekulares Tumorboard
NAC	Neoadjuvante Chemotherapie
OS	Gesamtüberleben
RC	Radikale Zystektomie
RFS	Rezidivfreies Überleben
TMT	Trimodale Therapie

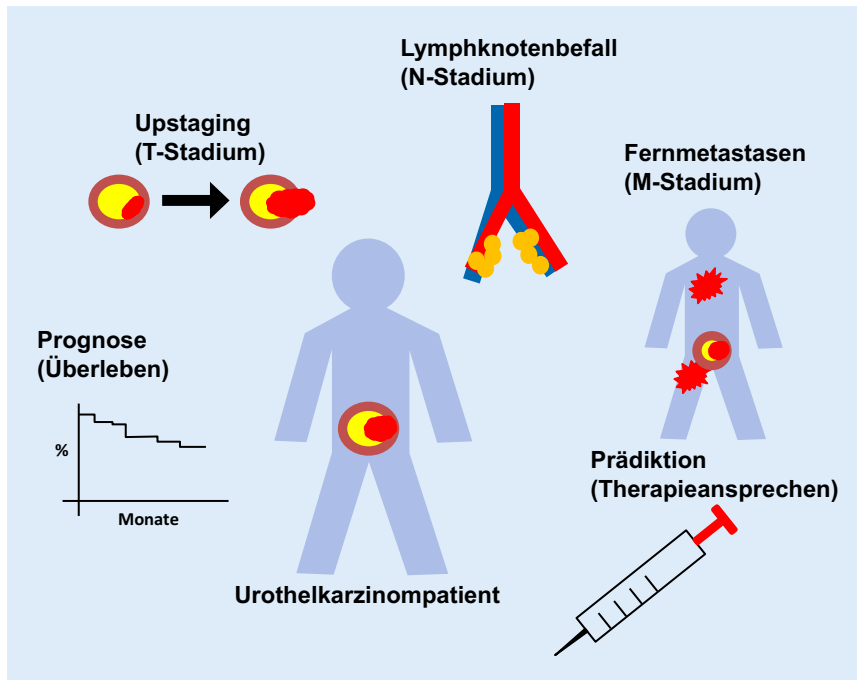


Abb. 1 ▲ Mögliche Fragestellungen an ein molekulares Tumorboard (MTB) Urothelkarzinom

kulare Testung durchgeführt. Von diesen 141 Fällen konnte in 92 Fällen (65 %) eine „medikamentös angreifbare“ molekulare Alteration identifiziert werden. Nur 29 von den 92 Patienten (32 %) erhielten letztlich eine zielgerichtete Therapie, von denen wiederum 13 Patienten (45 %) ein Therapieansprechen im weitesten Sinne zeigten. Der häufigste Grund einer nicht durchgeführten primären Testung war letztlich die Ablehnung durch den Patienten selber (42 %), während in nur 8 % der Fälle nicht ausreichend analysierbares Tumorgewebe vorhanden war. In die Kohorte von Bryce et al. wurde ein Patient mit einem Urothelkarzinom der Harnblase inkludiert, bei dem eine ERBB2-Amplifikation detektiert wurde. Der Patient erhielt eine zielgerichtete Therapie mit Trastuzumab und Pertuzumab und zeigte hierunter für einige Monate eine komplette Remission. Angaben zu Toxizitäten liegen nicht vor [4].

Harada et al. [11] beschreiben in ihrem Erfahrungsbericht aus Alabama eine Zeitspanne von ca. 4 Wochen vom Zeitpunkt der Gewebeanforderung zur Analyse bis zu einem MTB-Beschluss mit einer Therapieempfehlung, wobei die Gewebeanalyse inklusive Befunderstellung die längste Zeit in Anspruch nahm. Diese lange Zeitspanne muss bei Patienten mit

einer aggressiv fortschreitenden Krebserkrankung bedacht werden und ist daher als Limitation eines MTB zu sehen.

Es gibt 5 verschiedene mögliche Fragestellungen an ein „MTB-Urothelkarzinom“, die das Management dieser onkologischen Erkrankung individuell verbessern könnten (Abb. 1). Im Allgemeinen ist neben der (I) Prognose auch das (II) Therapieansprechen auf Systemtherapien von Interesse. Eine spezifische Herausforderung beim Urothelkarzinom ist das adäquate klinische Staging von Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase (MIBC) vor einer radikalen Zystektomie. Culp et al. [6] konnten in ihrer Zystektomiekohorte nachweisen, dass mittels präoperativ vorhandener Informationen (Histologie des TURB-Präparats [„transurethral resection of bladder tumor“] und Bildgebung) in 50 % der Fälle der Krankheitsstatus zu „mild“ eingestuft wurde, d. h. dass im Rahmen der finalen Zystektomiepathologie dann ein „Upstaging“ erfolgte. Aufgrund dessen interessieren beim Urothelkarzinom insbesondere auch (III) die Vorhersage eines Upstaging (T-Stadium) vom TURB-Präparat zum Zystektomiepräparat sowie (IV) die Vorhersage befallener Lymphknoten (LK) und (V) Fernmetastasen. Auf diese 5 mögli-

chen Fragestellungen an ein „MTB-Urothelkarzinom“ möchten wir im Folgenden genauer eingehen und potentielle Biomarker zur Beantwortung und Implementierung vorstellen. Hierbei wird auf das muskelinvasive und metastasierte Urothelkarzinom fokussiert.

Primärtumorstadium – Upstaging bei Zystektomie (T-Stadium)

Die Ausdehnung und Infiltrationstiefe ist einer der wichtigsten Risikofaktoren des Urothelkarzinoms der Harnblase. Den größten Einfluss auf das Überleben scheint der Übergang vom organbegrenzten Karzinom (pT1-2) zur extravasikalen Ausdehnung (pT3/4) zu spielen [31]. Während der Pathologie im TURB-Präparat nur die Muskelinvasion und somit ein pT2-Stadium feststellen kann, ist für ihn die Unterscheidung zwischen organbegrenzt und extravasikal nicht möglich. Die Bildgebung ist nur ungenügend in der Lage, das Primärtumorstadium zu diskriminieren [17]. Daher wurden molekulare Marker untersucht, die eine Assoziation mit dem Primärtumorstadium aufweisen.

Eine kürzlich erschienene Arbeit von Lotan et al. [18] untersuchte molekulare Marker im TURB-Präparat von Patienten mit cT1-2-Urothelkarzinom und verglich diese Marker mit der Upstaging-Rate zu einem extravasikalen Urothelkarzinom (\geq pT3) zum Zeitpunkt der Zystektomie. Lotan et al. [18] konnten zeigen, dass Urothelkarzinome vom molekularen Nicht-Luminal-like-Subtyp signifikant häufiger ein Upstaging zum pT3/4-Stadium zeigten, als jene vom Luminal-like-Subtyp (cT1: 13 % vs. 30 %, cT2: 34 % vs. 58 %, $p=0,002$). Dieser Effekt spiegelte sich in einem schlechteren krebspezifischen Überleben (CSS) für Urothelkarzinome vom Nicht-Luminal-like-Subtyp wider. Diese Daten könnten helfen, frühe neoadjuvante Systemtherapien gezielter einzusetzen. Jedoch ist eine unabhängige Validierung noch ausstehend.

Lymphknotenstadium bei Zystektomie (N-Stadium)

In verschiedenen größeren Serien wurde gezeigt, dass 20–25% der Urothelkarzinompatienten in der pathologischen Untersuchung Metastasen aufweisen, obwohl sie in der Bildgebung frei von Lymphknoten- (LK-) und Fernmetastasen waren (d.h. cN0M0; [6, 19]). Interessanterweise finden sich bei einem hohen Anteil der Patienten keine LK-Metastasen in der histologischen Aufarbeitung (pN0), auch wenn das vorherige klinische Staging eine nodale Positivität (cN+) aufwies (unpublizierte Daten). Daher wäre eine Verbesserung des LK-Stagings mittels molekularer Marker ein wichtiger Bestandteil des MTB.

» Eine Verbesserung des LK-Stagings mittels molekularer Marker wäre ein wichtiger Bestandteil des MTB

Smith et al. [30] untersuchten Genexpressionsprofile in Primärtumoren, um einen LK-Befall vorherzusagen. Sie verwendeten paraffinfixiertes Gewebe und auch frisches („fresh frozen“) Gewebe und glichen die erhobene Gensignatur zwischen Zystektomiepräparaten und TURB-Material ab. Diese „Normalisierung“ wurde vorgenommen, um den Classifier möglichst robust und vielseitig einsetzbar zu gestalten. In der multivariaten Analyse war der Classifier zwar der einzige signifikante Parameter, der mit dem histopathologischen LK-Status assoziiert war. Allerdings war die „area under the curve“ (AUC) von 0,67 eher klein, um zukünftige klinische Entscheidungen im Einzelfall allein darauf zu basieren.

Wir haben einen ähnlichen Classifier mit derselben Fragestellung untersucht [28]. Der Hauptunterschied zu oben genanntem Classifier liegt darin, dass wir eine „Whole-transcriptome-Analyse“ durchgeführt haben, also sämtliche RNA-Transkripte berücksichtigt wurden. Dadurch konnte die diagnostische Exaktheit erhöht werden mit einer AUC von 0,82. Ob diese Exaktheit für den klinischen Einsatz ausreichend ist, ist

Urologe 2019 · 58:760–767 <https://doi.org/10.1007/s00120-019-0967-5>
© Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature 2019

M. C. Hupe · G. Gakis · R. Seiler

Molekulares Tumorboard – Urothelkarzinom

Zusammenfassung

Hintergrund. Molekulare Tumorboards (MTB) finden immer mehr Einzug in den klinischen Alltag. Es gibt viele molekulare Alterationen beim Urothelkarzinom, die für potentielle Empfehlungen seitens eines MTB genutzt werden könnten.

Ziel der Arbeit. Es werden verschiedene molekulare Alterationen und deren Korrelation mit klinischen Endpunkten aufgezeigt sowie konkrete Fragestellungen an ein „MTB Urothelkarzinom“ herausgearbeitet.

Material und Methoden. Dieses ist ein deskriptiver Review mittels Literaturrecherche in PubMed.

Ergebnisse. Aufgrund der heterogenen molekularen Alterationen beim Urothelkarzinom fokussiert sich die aktuelle Biomarkerforschung nicht auf singuläre Biomarker, sondern auf Biomarkerpanels oder Classifier. Identifizierte molekulare Subtypen des Urothelkarzinoms werden aktuell mit verschiedenen Endpunkten korreliert. Zirkulierende Tumorzellen oder Tumor-DNA sind ebenso Gegenstand der aktuellen

Biomarkerforschung beim Urothelkarzinom. Neben dem Therapieansprechen und der Prognose sind beim Urothelkarzinom auch molekulare Marker zur Optimierung des klinischen Stagings vor etwaiger radikaler Zystektomie oder zur Selektion für eine neoadjuvante Chemotherapie von Interesse. Mit Erdafitinib ist seit kurzem nun die erste auf eine molekulare Alteration (FGFR-Alteration, „fibroblast growth factor receptor“) zielgerichtete Substanz beim Urothelkarzinom zugelassen (in den USA). **Diskussion.** Es fehlt bei den vielen identifizierten Biomarkern eine unabhängige Validierung für eine Implementierung in den Alltag. Zudem gibt es beim Urothelkarzinom im Gegensatz zu manch anderen Karzinomen keine einzelne Treibermutation, die die Entwicklung von Biomarkern und zielgerichteten Therapien einfacher gestaltet.

Schlüsselwörter

Prädiktionsmarker · Biomarker, Tumor · Alterationen, molekulare · Prognosemarker

Molecular tumor board—urothelial cancer

Abstract

Background. Molecular tumor boards (MTB) are becoming more common. There are several molecular alterations in urothelial cancer a molecular tumor board can potentially rely on.

Objectives. The aim is to specify molecular alterations and their correlations with different clinical endpoints and to highlight potential questions addressed to a MTB for urothelial cancer.

Materials and methods. Descriptive review of the literature based on PubMed.

Results. The landscape of molecular alterations in urothelial cancer is heterogeneous. Thus, recent biomarker research has been focusing on biomarker panels and classifiers instead of single biomarkers. Recently, molecular subtypes of urothelial cancer have been identified and correlated with different clinical endpoints. Furthermore, circulating tumor cells and tumor DNA are

under investigation as potential biomarkers. In addition to treatment response and prognosis, molecular markers are also needed to improve clinical staging prior to radical cystectomy or for proper patient selection for neoadjuvant chemotherapy. Erdafitinib is the first targeted therapy (fibroblast growth factor receptor [FGFR] alteration) in urothelial cancer that was recently approved (in the USA).

Conclusions. Due to the lack of external validation, none of the identified biomarkers is currently established in clinical routine. In addition, there is no single driver mutation in urothelial cancer that facilitates the development of biomarkers and targeted therapies.

Keywords

Predictive marker · Biomarkers, cancer · Alteration, molecular · Prognostic marker

noch immer fraglich. Zudem haben wir Zystektomiepräparate verwendet, jedoch hätte ein solcher Classifier v. a. in TURB-Präparaten einen Stellenwert.

Letztlich müssten diese Classifier vor ihrem klinischen Einsatz unabhängig validiert werden. Dieses gelang beispielsweise in der Arbeit von Van Kessel et al. [13] nicht, sodass wir zum gegenwärtigen Zeitpunkt mit molekularen Markern nach wie vor den LK-Status nicht besser vorhersagen können.

In der Biomarkerforschung zum Urothelkarzinom gibt es zwei unterschiedliche Sichtweisen zur Bedeutung des molekularen Profils des Primärtumorgewebes hinsichtlich der Prädiktion eines Lymphknotenbefalls. Einerseits gehen manche Forscher grundsätzlich davon aus, dass es möglich ist, anhand von molekularen Profilen im Primarius den LK-Status mit hoher Wahrscheinlichkeit vorherzusagen. In den USA werden derzeit größere Datensätze zusammengestellt, um diese Hypothese näher zu untersuchen. Andere Forschergruppen gehen davon

aus, dass die genetischen Nuancen im Primärtumor zu gering sind, um eine Diskriminierung zwischen pN0 vs. pN+ mit hinreichender Sicherheit zu ermöglichen.

Systemische Metastasierung (M-Stadium)

Für die Bestimmung einer systemischen Metastasierung wurden in der letzten Zeit sog. „liquid biopsies“ untersucht. Einerseits konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen im Blut mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind [25]. Dieses war ebenfalls bei nichtmetastasierten Patienten der Fall, also eine Art „molekularer“ Metastasierungs- und Prognosemarker. Allerdings ist das hierbei verwendete CellSearch®-System nicht optimal für die Untersuchung von Urothelkarzinomzellen. Es wird in neueren Ansätzen versucht, diese zirkulierenden Tumorzellen nicht nur zu messen, sondern molekular besser zu charakterisieren. Die Entwicklung dieser „Microflui-

dic-Technologien“ schreitet rasch voran, ist jedoch noch nicht für den klinischen Alltag geeignet.

» Die ctDNA-Bestimmung ermöglicht minimal-invasive longitudinale Verlaufsuntersuchungen

Andererseits wird im Blut von Urothelkarzinompatienten nach zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) gesucht [3, 32]. In der Mehrzahl der Patienten mit einer metastasierenden Erkrankung konnte mit diesen Assays ctDNA nachgewiesen werden, allerdings nur in etwa 14% der Patienten mit einer lokalisierten Erkrankung. Patienten mit positivem ctDNA-Nachweis hatten eine schlechtere Prognose [3]. Interessanterweise legen frühe Daten zur ctDNA nahe, dass Veränderungen im ctDNA-Profil mit dem Ansprechen auf eine Systemtherapie assoziiert sind [22, 32]. Diese Technologie

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

Tab. 1 Aktuell untersuchte potentielle Prognosemarker

	Kohorte	Parameter	OS	CSS	RFS
Seiler R et al. Eur Urol 2017 [27]	MIBC	Luminaler Subtyp	Günstig	–	–
	NAC	Claudin-low-Subtyp	Ungünstig	–	–
Mitra AP et al. J Natl Cancer Inst 2014 [21]	MIBC RC	15-feature Genomic Classifier: „high risk“	–	–	Ungünstig
Efstathiou J et al. Eur Urol 2018 [9]	MIBC TMT und RC	Immunogene Expressionssignatur	Kein Unterschied	Günstig in TMT-Kohorte	–
		Stromale Expressionssignatur	Ungünstig in RC-Kohorte	Ungünstig in RC-Kohorte	–
Volkmer PJ et al. Proc Natl Acad Sci USA 2012 [33]	NMIBC und MIBC	Basaler Subtyp vs. intermediärer oder differenzierter Subtyp	Ungünstig	–	–
Eckstein M et al. Int J Mol Scie 2018 [8]	MIBC RC	Niedrige KRT5-mRNA-Expression	–	Ungünstig	Ungünstig
		Hohe KRT20-mRNA-Expression	–	Ungünstig	Ungünstig
		Hohe KRT20 in Kombination mit niedriger KRT5-mRNA-Expression	–	Sehr ungünstig	Sehr ungünstig
Kriegmair MC et al. Transl Oncol 2018 [16]	MIBC RC	Hohe Her2-mRNA-Expression	–	Ungünstig	Ungünstig
Rinaldetti S et al. Oncotarget 2017 [24]	MIBC RC	Hohe FOXM1-mRNA-Expression	Ungünstig	Ungünstig	–
Worst TS et al. Sci Rep 2018 [35]	MIBC RC	Hohe CDKN2A-mRNA-Expression	–	Ungünstig	Ungünstig

CSS krebspezifisches Überleben, MIBC muskelinvasives Blasenkarzinom, NAC neoadjuvante Chemotherapie, NMIBC nichtmuskelinvasives Blasenkarzinom, OS Gesamtüberleben, RC radikale Zystektomie, RFS rezidivfreies Überleben, TMT trimodale Therapie

wurde auch als personalisierter Assay für das Follow-up des einzelnen Patienten evaluiert [5].

Die ctDNA-Bestimmung ermöglicht minimal-invasive longitudinale Verlaufuntersuchungen und vermag in einigen Fällen behandelbare Alterationen nachzuweisen. Viele derzeit laufende klinische Studien inkludieren ctDNA als translationalen Biomarker, sodass in Zukunft solidere Daten hierzu zu erwarten sind.

Prognosemarker

Wie eingangs beschrieben sind bereits eine Vielzahl an molekularen Markern hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit untersucht worden. Allerdings ist bislang kein Marker in die klinische Routine überführt worden. Mitra [20] führt in seinem Übersichtsartikel aus 2016 eine Vielzahl der bis dato untersuchten Marker übersichtlich zusammen, u. a. p53, FGFR3 („fibroblast growth factor receptor“), VEGF („vascular endothelial growth factor“) oder MMP2/9 („matrix metalloproteinase“). Der folgende Abschnitt legt daher den Fokus auf ab

diesem Zeitpunkt untersuchte neue potentielle prognostische Marker. ■ Tab. 1 gibt einen begleitenden Überblick.

Die molekulare Subtypisierung von MIBC in „claudin-low“, basale, luminal infiltrierende und luminal Tumoren ist aktuell der am häufigsten in verschiedensten Forschungsarbeiten reproduzierte „Biomarker“. Auch unsere Arbeit aus 2017 [27] an einer großen Kohorte bestehend aus Patienten vor neoadjuvanter Chemotherapie (NAC) und einer Vergleichskohorte aus Patienten ohne NAC konnte eine prognostische Wertigkeit dieser Subtypisierung aufzeigen. So scheinen Patienten mit einem luminalen Tumor günstigere Gesamtüberlebensraten (OS), mit oder ohne NAC, zu haben, wohingegen Patienten mit einem claudin-low-Tumor, auch trotz NAC, ungünstigere OS-Raten zu haben scheinen [27].

Aufgrund der Heterogenität von Urothelkarzinomen haben auch Mitra et al. [21] nicht einen singulären Marker, sondern ein Biomarkerpanel an einer Zystektomiekohorte untersucht, um einen „genomic classifier“ identifizieren zu können. In der Arbeit konnte ein Classifier

aus 15 Genen mit einer hohen Genauigkeit, v. a. im Kombination mit etablierten klinischen Parametern, ein Rezidiv vorhersagen (AUC 0,77).

Neben der radikalen Zystektomie ist auch die trimodale Therapie (TMT) bestehend aus TURB, Radiatio und Chemotherapie eine Therapieoption bei MIBC. Efstathiou et al. [9] haben das Expressionsmuster einer großen TMT- sowie einer Zystektomiekohorte analysiert und hierbei festgestellt, dass eine immunogene Genexpressionssignatur in der TMT-Kohorte zu einem günstigen CSS führte, während eine stromale Genexpressionssignatur in der Zystektomiekohorte mit einem ungünstigen CSS und OS assoziiert war. Die oben angesprochenen Subtypen scheinen in der TMT-Kohorte als Prognosemarker hier keine Rolle zu spielen.

Schon 2012 zeigten Volkmer et al. [33] den Ansatz, Urothelkarzinome anhand von Differenzierungsmarkern (Keratin 5, Keratin 14 und Keratin 20) sowie Oberflächenmarkern (CD90, CD44 und CD49f) in die Subtypen basal, intermediär und differenziert zu unterteilen. In ihrer Arbeit waren die basalen Sub-

typen (K14+, K5+, K20- bzw. CD90+, CD44+, CD49f+) mit einer ungünstigeren OS-Rate im Vergleich zu den anderen Subtypen verbunden. Die Keratine 5 und 20 wurden von Eckstein et al. [8] hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft in einer MIBC-Kohorte erneut untersucht worden. In dieser Kohorte war eine hohe Keratin-20-Expression sowie eine niedrige Keratin-5-Expression mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert (■ Tab. 1). Diese Ergebnisse scheinen jedoch im Gegensatz zu der vorher beschriebenen Arbeit von Volkmer et al. [33] zustehen, da der basale Subtyp mit schlechter Prognose hier durch K14+K5+K20- definiert war.

Die ursprüngliche Idee der Subtypisierung von Urothelkarzinomen kommt aus der Mammakarzinomforschung. Das Mammakarzinom wird bereits routinemäßig anhand der Marker Her2 („human epidermal growth factor 2“), ESR1 („estrogen receptor 1“), PGR („progesterone receptor“) und Ki67 in die 4 Subtypen: Her2 positiv, Luminal A, Luminal B und Triple negativ eingeteilt. Kriegmair et al. [16] führten diese Subtypisierung analog an einer großen Zystektomiekohorte durch. Nur Her2 war in dieser Arbeit ein robuster Marker, der bei einer erhöhten Expression (mRNA-Level) mit einem ungünstigeren CSS und RFS assoziiert war.

Das Zellzyklusgen FOXM1 („Forkhead box M1“) wurde von Rinaldetti et al. [24] in einer großen Kohorten evaluiert. In dieser Studie korrelierte eine erhöhte FOXM1-mRNA-Expression mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf (OS, CSS). Ein weiteres aktuell untersuchtes Zellzyklusgen ist CDKN2A (s. unten), welches das Protein p16 kodiert. Worst et al. [35] attestieren in ihrer Arbeit einer hohen CDKN2A-mRNA-Expression ein ungünstiges RFS und CSS.

Zusammenfassend dominieren aktuell die molekulare Subtypisierung, Transkriptomanalysen sowie Untersuchungen einzelner Zellzyklusmarker die Prognosemarkerlandschaft beim Urothelkarzinom.

Prädiktionsmarker

Trotz der neuesten Entwicklungen auf dem Gebiet der Immunonkologie werden ca. 75 % der Patienten nach Zweitlinientherapie mit einem PD-(L)1-Inhibitor einen Progress ihrer Erkrankung erfahren [2]. Vor dem Hintergrund der Zulassungsdaten aus der Keynote-45-Studie zum Einsatz von Pembrolizumab gegenüber einer konventionellen zytotoxischen Therapie mit Vinflunin haben sich im vergangenen Jahr die Empfehlungen der EAU zum metastasierten Harnblasenkarzinom verändert [34]. Daher wird mittlerweile eine Therapie mit Pembrolizumab einer Behandlung mit Vinflunin im klinischen Alltag vorgezogen. Allerdings ist hier die Frage nach dem Stellenwert einer etablierten Drittlinientherapie bei Progress nicht abschließend geklärt. Daten zum Einsatz von Vinflunin nach PD-(L)1-Inhibitortherapie sind nicht in ausreichendem Ausmaß vorhanden, um eine klare Empfehlung zum Einsatz einer zytotoxischen Chemotherapie nach Versagen einer PD-(L)1-Inhibitortherapie auszusprechen. In der Tat wird jedoch heutzutage Vinflunin gegenüber dem Einsatz einer möglichen zielgerichteten Therapie aufgrund des bekannten Sicherheitsprofils vorgezogen. Die Frage nach einer etablierten Drittlinientherapie wird sich damit in diesem klinischen Kontext noch in verschärfter Weise stellen. Auch ist in diesem Zusammenhang unklar, ob ein frühzeitiger Einsatz einer molekularen Therapie prognostisch günstiger als ein ungezielter Einsatz von etablierten zytotoxischen Systemtherapien ist. In diesem Zusammenhang muss daher auch die Frage geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt nach Progress eine molekulare Sequenzierung des Tumors erfolgen sollte. Auch ist unklar, inwieweit eine Bestimmung eines Expressionsprofils aus dem bei der Zystektomie gewonnenen Gewebe repräsentativ für das tumorbiologische Verhalten der Metastase Monate bis Jahre nach erfolgter Primärtherapie ist. Hier konnten beispielsweise de Jong et al. [12] zeigen, dass sich die PD-L1-Expression während des Progresses eines muskelinvasiven Urothelkarzinoms deutlich verändert.

Ein in jüngster Zeit häufig beschriebenes Molekül für eine molekulare Therapie in der Drittliniensituation stellt der FGFR-3-Rezeptor dar. Hierbei handelte es sich um eine Rezeptortyrosinkinase, die in verschiedenen anderen Entitäten (Zervix, multiples Myelom) als potentielles Target beschrieben wurde. Aktivierende FGFR-3-Mutationen wurden zunächst in der Literatur als genetische Alterationen bei 84 % der Low-grade-Urothelkarzinome festgestellt, wohingegen nur 16 % der High-grade-Urothelkarzinome diese Mutationen aufweisen [1]. Interessanterweise zeigt ein niedriger Anteil von FGFR-3-mutierten Low-grade-Urothelkarzinomen einen Progress im Grading und Staging trotz adäquater Therapie. Hierbei konnte vor Beginn eines histopathologischen Progresses eine homozygote Deletion des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors 2A (CDKN2A) als Treibermutation für ein FGFR-3-mutiertes Urothelkarzinom beschrieben werden [7], die auch bei Progress zur Muskelinvasion ursächlich ist [23].

» Metastasierte Urothelkarzinome mit FGFR-Alterationen/ Aktivierung sind mit Erdaftinib therapierbar

Die Rationale für den derzeitigen Einsatz von FGFR-3-Inhibitoren beim metastasierten und PD-(L)1-vorbehandelten Patienten lieferte eine auf dem ASCO 2018 (American Society of Clinical Oncology) vorgestellte Phase-II-Studie, in der bei 99 Patienten mit mutierten FGFR-3-Status Erdaftinib eingesetzt wurde [29]. Erdaftinib ist ein oral verfügbares Medikament, das alle FGFR-Proteine (u. a. FGFR-3) inhibiert, welche bei 15–20 % der metastasierten Urothelkarzinome alteriert ist. Erdaftinib wurde in dieser Studie in einer Dosis von 8 mg/Tag über einen 28-Tage-Zyklus über 5 Zyklen eingenommen. Hiervon waren 22 Patienten mit einem PD-(L)1-Inhibitor vorbehandelt. Die Gesamtansprechrate lag bei 40 % (3 % komplettes Ansprechen), wobei diese Rate unter den PD-(L)1-vorbehandelten

Patienten bei 59% lag. Das mediane Gesamtüberleben lag bei 14 Monaten und nur 10% der Patienten mussten die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen vorzeitig beenden. Weitere Aspekte zur onkologischen Wirksamkeit der Substanz sollen nun im Rahmen einer Phase-III-Studie weiter untersucht werden. Nichtsdestotrotz wurde Erdafitinib aufgrund dieser Daten von der FDA (Food and Drug Administration) mit einem „breakthrough designation status“ ausgezeichnet. Darüber hinaus werden nun auch selektivere FGFR-3-Inhibitoren wie ASP5878 und BGJ398 in klinischen Studien näher untersucht, welche in der präklinischen Forschung bei Paclitaxel-resistenten Zelllinien zu einer Tumorreduktion führten [14].

Schlussfolgerung – Wieso sind noch keine Marker beim Urothelkarzinom implementiert?

Verschiedene Aspekte (ungenaueres klinisches Staging, variable Prognosen, unterschiedliches Ansprechen auf Systemtherapien etc.) erschweren die klinische Entscheidung für eine individualisierte Therapie des einzelnen Urothelkarzinompatienten. Deshalb wären etablierte molekulare Marker für den klinischen Alltag äußerst hilfreich, allerdings bis dato nicht verfügbar. Die Gründe dafür sind vielfältig: Bisher fehlt bei vielen Biomarkern eine unabhängige Validierung oder eine Evaluation dieser Biomarker als Entscheidungsparameter für Therapien in klinischen Studien. Die molekulare Landschaft des muskelinvasiven und metastasierten Urothelkarzinoms ist heterogen. Es fehlt im Gegensatz zu anderen Karzinomen (Kolon, Lunge) eine einzelne Treibermutation, sodass eine direkte Verbindung von molekularen Alterationen zu einer entsprechenden Therapie aktuell noch nicht möglich ist.

» Urothelkarzinome lassen sich in molekulare Subtypen einteilen

Allerdings sind in jüngster Zeit Fortschritte zu verzeichnen: Urothelkarzinome lassen sich in molekulare Subtypen

einteilen. Hier steht jedoch eine Validierung der Bedeutung dieser Subtypen für den möglichen Einsatz im klinischen Alltag aus. Die Immuntherapie hat insbesondere die Therapie des Urothelkarzinoms revolutioniert. Bedingt durch neu gewonnenen Daten zu einer möglichen onkologischen Ineffizienz einer PD-(L)1-Inhibition bei PD-(L)1-negativen Tumoren, resultierend aus einer laufenden Phase-III-Studie zum Einsatz von Pembrolizumab in der Erstlinientherapie des metastasierten Urothelkarzinoms, wurde Mitte vergangenen Jahres eine Zulassungsbeschränkung für den Einsatz von Pembrolizumab und Atezolizumab bei Cisplatin-unfitten metastasierten Urothelkarzinompatienten ausgesprochen. Dieser Umstand hat letztendlich trotz fehlender Datenlage zur Einführung des ersten „klinisch etablierten“ Biomarkers beim metastasierten Urothelkarzinom geführt. Nunmehr muss in diesem spezifischen Setting vor Einleitung einer PD-(L)1-Inhibition die PD-L1-Expression evaluiert werden [34].

Zudem wurde vor kurzem die erste „targeted therapy“ für das metastasierte Urothelkarzinom von der FDA zugelassen. Metastasierte, nicht resektable Urothelkarzinome mit einer FGFR-Alteration/Aktivierung können nun mit Erdafitinib behandelt werden. Das bessere Verständnis der molekularen Landschaft des muskelinvasiven Urothelkarzinoms darf auf weitere, ähnliche Durchbrüche in der Zukunft hoffen lassen. Nichtsdestotrotz ist es vor dem Hintergrund einer aufkommenden Vielzahl von molekularen Targets wünschenswert, dass zukünftig vor klinischer Implementierung die Validität von Biomarkern in klinischen Studien getestet wird.

Fazit für die Praxis

- Die molekulare Landschaft des Urothelkarzinoms ist in ersten Studien mit Tumorstadium, Prognose und Therapieansprechen assoziiert, allerdings sind Validierungen für die klinische Implementierung dieser Biomarker ausstehend.
- Biomarker könnten in der Zukunft eingesetzt werden, um das finale Staging des Urothelkarzinoms (T, N

und M), die Prognose für den jeweiligen Patienten und ein Therapieansprechen besser vorherzusagen.

- Die Immuntherapie hat die Behandlung des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms revolutioniert – Biomarker, die das Ansprechen vorhersagen könnten, sind jedoch noch nicht für den klinischen Alltag einsatzbereit.
- Die erste Therapie, welche aufgrund einer molekularen Alteration eingesetzt werden kann, wurde nun von der FDA (Food and Drug Administration) in den USA zugelassen: metastasierte Urothelkarzinome mit FGFR-Alterationen/Aktivierung („fibroblast growth factor receptor“) können mit dem oralen Pan-FGFR-Inhibitor Erdafitinib therapiert werden.

Korrespondenzadresse

Dr. med. M. C. Hupe

Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck,
Deutschland
mariechristine.hupe@uksh.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. R. Seiler: Mitbeteiligung an Patent eines Genomic Classifiers (Hauptinhaber: GenomeDX Biosciences, Vancouver, BC). M.C. Hupe und G. Gakis geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Literatur

1. Al-Ahmadie HA, Iyer G, Janakiraman M, Lin O, Heguy A, Tickoo SK, Fine SW, Gopalan A, Chen YB, Balar A, Riches J, Bochner B, Dalbagni G, Bajorin DF, Reuter VE, Milowsky MI, Solit DB (2011) Somatic mutation of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3) defines a distinct morphological subtype of high-grade urothelial carcinoma. *J Pathol* 224:270–279
2. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, Vogelzang NJ, Climent MA, Petrylak DP, Choueiri TK, Necchi A, Gerritsen W, Gurney H, Quinn DI, Culine S, Sternberg CN, Mai Y, Poehlein CH, Perini RF, Bajorin DF, KEYNOTE-045 Investigators (2017) Pembrolizumab as second-line therapy

- for advanced urothelial carcinoma. *N Engl J Med* 376:1015–1026
3. Birkenkamp-Demtröder K, Christensen E, Nordentoft I, Knudsen M, Taber A, Høyer S, Lamy P, Agerbæk M, Jensen JB, Dyrskjot L (2018) Monitoring treatment response and metastatic relapse in advanced bladder cancer by liquid biopsy analysis. *Eur Urol* 73:535–540
 4. Bryce AH, Egan JB, Borad MJ, Stewart AK, Nowakowski GS, Chanan-Khan A, Patnaik MM, Ansell SM, Banck MS, Robinson SI, Mansfield AS, Klee EW, Oliver GR, McCormick JB, Huneke NE, Tagtow CM, Jenkins RB, Rumilla KM, Kerr SE, Kocher JA, Beck SA, Fernandez-Zapico ME, Farrugia G, Lazaridis KN, McWilliams RR (2017) Experience with precision genomics and tumor board, indicates frequent target identification, but barriers to delivery. *Oncotarget* 8:27145–27154
 5. Christensen E, Nordentoft I, Vang S, Birkenkamp-Demtröder K, Jensen JB, Agerbæk M, Pedersen JS, Dyrskjot L (2018) Optimized targeted sequencing of cell-free plasma DNA from bladder cancer patients. *Sci Rep* 8:1917
 6. Culp SH, Dickstein RJ, Grossman HB, Pretzsch SM, Porten S, Daneshmand S, Cai J, Groshen S, Siefker-Radtke A, Millikan RE, Czerniak B, Navai N, Wszolek MF, Kamat AM, Dinney CP (2014) Refining patient selection for neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy. *J Urol* 191:40–47
 7. Downes MR, Weening B, van Rhijn BW, Have CL, Treurniet KM, van der Kwast TH (2017) Analysis of papillary urothelial carcinomas of the bladder with grade heterogeneity: Supportive evidence for an early role of CDKN2A deletions in the FGFR3 pathway. *Histopathology* 70:281–289
 8. Eckstein M, Wirtz RM, Gross-Weege M, Breyer J, Otto W, Stoehr R, Sikic D, Keck B, Eidt S, Burger M, Bolenz C, Nitschke K, Porubsky S, Hartmann A, Erben P (2018) mRNA-expression of KRT5 and KRT20 defines distinct prognostic subgroups of muscle-invasive urothelial bladder cancer correlating with histological variants. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms19113396>
 9. Efsthathiou JA, Mouw KW, Gibb EA, Liu Y, Wu CL, Drumm MR, da Costa JB, du Plessis M, Wang NQ, Davicioni E, Feng FY, Seiler R, Black PC, Shipley WU, Miyamoto DT (2019) Impact of immune and stromal infiltration on outcomes following bladder-sparing trimodality therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. <https://doi.org/10.1016/j.euro.2019.01.011>
 10. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. (GEKID), Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKID) (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014 Bd. 11. Robert-Koch-Institut, Berlin, S 104–107
 11. Harada S, Arend R, Dai Q, Levesque JA, Winokur TS, Guo R, Heslin MJ, Nabell L, Nabors LB, Limdi NA, Roth KA, Partridge EE, Siegal GP, Yang ES (2017) Implementation and utilization of the molecular tumor board to guide precision medicine. *Oncotarget* 8(34):57845–57854
 12. de Jong JJ, Stoop H, Nieboer D, Boormans JL, van Leenders GJLH (2018) Concordance of PD-L1 expression in matched urothelial bladder cancer specimens. *Histopathology* 73:983–989
 13. van Kessel KE, van de Werken HJ, Lurkin I, Ziel-van der Made AC, Zwarthoff EC, Boormans JL (2017) A reported 20-gene expression signature to predict lymph node-positive disease at radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer is clinically not applicable. *PLoS ONE* 12:e174039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174039>
 14. Kim SH, Ryu H, Ock CY, Suh KJ, Lee JY, Kim JW, Lee JO, Kim JW, Kim YJ, Lee KW, Bang SM, Kim JH, Lee JS, Ahn JB, Kim KJ, Rha SY (2018) BGJ398, a pan-FGFR inhibitor, overcomes paclitaxel resistance in urothelial carcinoma with FGFR1 overexpression. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms19103164>
 15. Knepper TC, Bell GC, Hicks JK, Padron E, Teer JK, Vo TT, Gillis NK, Mason NT, McLeod HL, Walko CM (2017) Key lessons learned from Moffitt's molecular tumor board: The clinical genomics action committee experience. *Oncologist* 22:144–151
 16. Kriegmair MC, Wirtz RM, Worst TS, Breyer J, Ritter M, Keck B, Boehmer C, Otto W, Eckstein M, Weis CA, Hartmann A, Bolenz C, Erben P (2018) Prognostic value of molecular breast cancer subtypes based on Her2, ESR1, PGR and Ki67 mRNA-expression in muscle invasive bladder cancer. *Transl Oncol* 11:467–476
 17. Kundra V, Silverman PM (2003) Imaging in oncology from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Imaging in the diagnosis, staging, and follow-up of cancer of the urinary bladder. *AJR Am J Roentgenol* 180:1045–1054
 18. Lotan Y, Boorjian SA, Zhang J, Bivalacqua TJ, Porten SP, Lerner SP, Wheeler TM, Hutchinson R, Francis F, Du Plessis M, Davicioni E, Svatek R, Black P, Gibb EA (2019) Molecular subtyping reveals luminal bladder tumors have lower rates of pathological upstaging at radical cystectomy. *Eur Urol Suppl* 18:e634–e635
 19. Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, Thalmann GN, Danuser H, Markwalder R, Studer UE (2003) Radical cystectomy for bladder cancer today—A homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol* 21:690–696
 20. Mitra AP (2016) Molecular substratification of bladder cancer: Moving towards Individualized patient management. *Ther Adv Urol* 8:215–233
 21. Mitra AP, Lam LL, Ghadessi M, Erho N, Vergara IA, Alshalfal M, Buerki C, Haddad Z, Sierocinski T, Triche TJ, Skinner EC, Davicioni E, Daneshmand S, Black PC (2014) Discovery and validation of novel expression signature for postcystectomy recurrence in high-risk bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju290>
 22. Patel KM, van der Vos KE, Smith CG, Mouliere F, Tsui D, Morris J, Chandrananda D, Marass F, van den Broek D, Neal DE, Gnanaprasam VJ, Forshew T, van Rhijn BW, Massie CE, Rosenfeld N, van der Heijden MS (2017) Association of plasma and urinary mutant DNA with clinical outcomes in muscle invasive bladder cancer. *Sci Rep* 7:5554
 23. Rebouissou S, Héroult A, Letouzé E, Neuzillet Y, Laplanche A, Ofualuka K, Maillé P, Leroy K, Riou A, Lepage ML, Vordos D, de la Taille A, Denoux Y, Sibony M, Guyon F, Lebreton T, Benhamou S, Allory Y, Radvanyi F (2012) CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *J Pathol* 227:315–324
 24. Rinaldetti S, Wirtz RM, Worst TS, Eckstein M, Weis CA, Breyer J, Otto W, Bolenz C, Hartmann A, Erben P (2017) FOXM1 predicts overall and disease specific survival in muscle-invasive urothelial carcinoma and presents a differential expression between bladder cancer subtypes. *Oncotarget* 8:47595–47606
 25. Rink M, Chun FK, Dahlem R, Soave A, Minner S, Hansen J, Stoupiec M, Coith C, Kluth LA, Ahyai SA, Friedrich MG, Shariat SF, Fisch M, Pantel K, Rhiethdorf S (2012) Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: A prospective study. *Eur Urol* 61:810–817
 26. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ (2005) Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol* 174:14–20
 27. Seiler R, Ashab HAD, Erho N, van Rhijn BWG, Winters B, Douglas J, Van Kessel KE, Frans van de Putte EE, Sommerlad M, Wang NQ, Choeuring V, Gibb EA, Palmer-Aronsten B, Lam LL, Buerki C, Davicioni E, Sjödal G, Kardos J, Hoadley KA, Lerner SP, McConkey DJ, Choi W, Kim WY, Kiss B, Thalmann GN, Todenhöfer T, Crabb SJ, North S, Zwarthoff EC, Boormans JL, Wright J, Dall'Era M, van der Heijden MS, Black PC (2017) Impact of molecular subtypes in muscle-invasive bladder cancer on predicting response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Eur Urol* 72:544–554
 28. Seiler R, Lam LL, Erho N, Takhar M, Mitra AP, Buerki C, Davicioni E, Skinner EC, Daneshmand S, Black PC (2016) Prediction of lymph node metastasis in patients with bladder cancer using whole transcriptome gene expression signatures. *J Urol* 196:1036–1041
 29. Siefker-Radtke AO, Necchi A, Rosenbaum E, Culine S, Burgess EF, O'Donnell PH, Tagawa ST, Zakharia Y, OHagan A, Avadhani AN, Zhong B, Santiago-Walker AE, Roccia T, Loriot Y (2018) Efficacy of programmed death 1 (PD-1) and programmed death 1 ligand (PD-L1) inhibitors in patients with FGFR mutations and gene fusions: Results from a data analysis of an ongoing phase 2 study of erdafitinib (JNJ-42756493) in patients (pts) with advanced urothelial cancer (UC). *J Clin Oncol* 36(6_suppl):450–450
 30. Smith SC, Baras AS, Dancik G, Ru Y, Ding KF, Moskaluk CA, Fradet Y, Lehmann J, Stöckle M, Hartmann A, Lee JK, Theodorescu D (2011) A 20-gene model for molecular nodal staging of bladder cancer: Development and prospective assessment. *Lancet Oncol* 12:137–143
 31. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG (2001) Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: Long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 19:666–675
 32. Vandekerckhove G, Todenhöfer T, Annala M, Struss WJ, Wong A, Beja K, Ritch E, Brahmabhatt S, Volik SV, Hennenlotter J, Nykter M, Chi KN, North S, Stenzl A, Collins CC, Eigl BJ, Black PC, Wyatt AW (2017) Circulating tumor DNA reveals clinically actionable somatic genome of metastatic bladder cancer. *Clin Cancer Res* 23:6487–6497
 33. Volkmer JP, Shahood D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova AV, Willingham SB, Pazhanisamy SK, Contreras-Trujillo H, Storm TA, Lotan Y, Beck AH, Chung BI, Alizadeh AA, Godoy G, Lerner SP, van de Rijn M, Shortliffe LD, Weissman IL, Chan KS (2012) Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2078–2083
 34. Witjes JA, Bruins M, Cathomas R, Comperat E, Cowan NC, Gakis G, Hernandez V, Lorch A, Ribal MJ, Thalmann GN, van der Heijden AG, Veskimäe E (2019) European Association of Urology Guidelines on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer. <https://uroweb.org/guideline/bladder-cancer-muscle-invasive-and-metastatic/>. Zugegriffen: 29. März 2019
 35. Worst TS, Weis CA, Stöhr R, Bertz S, Eckstein M, Otto W, Breyer J, Hartmann A, Bolenz C, Wirtz RM, Erben P (2018) CDKN2A as transcriptomic marker for muscle-invasive bladder cancer risk stratification and therapy decision-making. *Sci Rep* 8:14383