

Vortrag über

Harnblasenkarzinom

- Neue Aspekte in Diagnostik und Therapie (Oberarzt Dr.med. Machtens)

- Neue molekularpathologische Untersuchungen zur Früherkennung und Verlaufskontrolle des Harnblasenkarzinom – UroVysion (Prof.Dr.med.Richter und Dr.med.vet. Katrin Henneicke)

am 19.02.2003 im Großen Vortragssaal des Ärztehauses der Ärztekammer Niedersachsen, Hamburger Allee 20, 30175 Hannover

Sehr geehrte Damen und Herren,

von Herrn OA Machtens haben wir eine sehr gute Präsentation über die Klinik des Harnblasenkarzinoms, über Nachweismethoden, Therapie und klinische Diagnostik gehört.

Vor die Therapie aber haben die Götter bekanntlicherweise die Diagnose gestellt.

Wo stehen wir heute in der morphologischen Diagnostik der Harnblasenkarzinome einschließlich der Früherkennung von Harnblasenkarzinomen und deren Verlaufskontrolle?

Historisch (siehe Folie 2) gesehen umfaßt die morphologische Diagnostik verschiedene Methoden, die einmal gegeben sind durch die:

1. Makroskopie
2. Histologie
3. Zytologie
 - konventionell
 - sog. Dünnschichtzytologie bzw. flüssigkeitsgestützte Zytologie
4. Immunhistologie/Immunzytologie
5. DNA-Zytometrie
6. Molekulare Nachweismethoden (FISH/Urovysion).
Bzgl. der molekularen Diagnostik hat Herr Oberarzt Dr. Machtens bereits auf einige klinisch relevante Onkoproteine hingewiesen, die uns in der Diagnostik hilfreich sein können.

Die gebräuchlichste morphologische Methode ist der zytologische Nachweis von suspekten Urothelien im Urin - und damit beginnt bereits ein diagnostisches Dilemma; denn die zytologischen Malignitätskriterien der unterschiedlich differenzierten Urotheltumoren - also G1 bis G3 - sind nicht immer so deutlich ausgeprägt, als dass in jedem Falle zweifelsfrei eine entsprechende Typisierung vorgenommen werden könnte oder sie für eine valide zytologische Interpretation

ausreichen (siehe Folie 3). Die wenig differenzierten Tumoren (G3 bis G4) machen in der Regel weniger Schwierigkeiten – vorausgesetzt der Urin ist ausreichend zellhaltig und die Zellen sind gut erhalten. Diagnostische Schwierigkeiten machen in der Regel die G1- und z.T. auch die G2-Tumoren. Histologisch sind diese Tumoren sehr gut bzw. gut differenziert. Die geringfügige Kern- und Zellpolymorphie oder die nur geringfügig oder gar nicht ausgeprägten zytologischen Malignitätskriterien lassen sich aus den histologischen Bildern (siehe Folie 4-6) sehr gut ableiten.

Die relativ geringe Sensitivität und - weniger stark – die Spezifität von gut differenzierten Tumorzellen lassen sich vor allem durch molekulare Nachweismethoden erhöhen. Da stehen uns seit längerer Zeit die von Herrn Machtens bereits erwähnten sog. Onkoproteine zur Verfügung. U. a. hatten wir seit vielen Jahren das Onkoprotein 486p3/12 in der Verlaufskontrolle von Urothelkarzinomen eingesetzt. In der Zwischenzeit aber haben sich wesentlich bessere und validere molekularpathologische Methoden etabliert:

So z. B. ist die Fluoreszenz in situ-Typisierung (FISH bzw. Multicolor-Urovysion-Test) eine Methode, mit deren Hilfe genetische Aberrationen auf verschiedenen Chromosomen nachgewiesen werden können.

Die Sensitivität des zytologischen Nachweises von Urotheltumoren in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Differenzierung beträgt in den aufgeführten Tabellen für G1-Tumoren lediglich ca. 50 % (siehe Folie 7). Die Angaben über die Sensitivität der Urinzytologie schwanken in der Literatur sehr und sind vor allem vom dem zytologisch tätigen Untersucher geprägt. Mit Zunahme der Entdifferenzierung erhöht sich naturgemäß die Aussagekraft. G3-Tumoren machen unter den oben genannten Voraussetzungen diagnostisch in der Regel keine oder wenig Probleme.

Auf der Folie 8 sind die Neuerkrankungen verschiedener maligner Tumoren in Europa aufgelistet. Das Harnblasenkarzinom ist mit 45100 Neuerkrankungen in Europa vertreten. In Deutschland (Folie 9) werden jährlich ca. 13000 Neuerkrankungen an Harnblasenkarzinomen diagnostiziert. Damit ist das Harnblasenkarzinom in Deutschland der fünfthäufigste Tumor.

In der Folie 10 sind die malignen Abkömmlinge des normalen Urothels demonstriert. Dabei sind zwei Gruppen zu verzeichnen.

Die eine Gruppe besteht aus den oberflächlichen Harnblasenkarzinomen pTaG1/G2. Diese Tumore besitzen eine genetische Stabilität, zeichnen sich durch eine geringe Progredienz und geringe Rezidivrate sowie langsames Wachstum aus. Sie rezidivieren in der Regel als ein pTaG1/G2-Tumor. Wenn überhaupt, gehen max. 5% in weniger differenzierte und invasive Tumore über.

Die zweite Gruppe besitzt ein von vornherein größeres Malignitätspotential, ist schlechter differenziert (G3/G4) und wächst nach einer relativ kurzen Latenz invasiv. Die Ursache für dieses unterschiedliche biologische Verhalten dieser zwei Tumorgruppen dürfte in einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund liegen.

Harnblasenkarzinome sind – wie auch andere Malignome – chromosomale Erkrankungen (Deregulierung des normalen Zellzyklus; Deregulierung von Proliferation und Apoptose usw. Siehe Folie 11).

Vor Besprechung der molekularbiologischen Grundlagen des Urovysion-Testes müssen wir einen „Abstecher“ in die normale Zellbiologie und Zellgenetik unternehmen, da gewisse Kenntnisse des normalen Zellzyklus Voraussetzungen dafür sind, genetische Aberrationen zu verstehen.

Die Regulation des normalen Zellzyklus ist ein multifaktorielles, komplexes und recht kompliziertes Geschehen :

Der normale Zellzyklus ist auf den Folien 12-17 dargestellt. Der Zellzyklus unterliegt einem sehr spezialisierten und vielschichtigen „Regelmechanismus“, wobei zahlreiche aufeinander abgestimmte Interaktionen zwischen Kompartimenten des Kernes, des Zytoplasmas, der Zellmembran und des extrazellulären Raumes erforderlich sind.

Der Zellzyklus wird in eine G₀-Phase, G₁-Phase, S-Phase (Synthesephase), G₂-Phase und M-Phase (Mitosephase) unterteilt. Dieser Zyklus besitzt drei markante Punkte, an denen jeweils die einzelnen Phasen ineinander übergehen und die Angriffspunkte der Regulationsmechanismen darstellen. Das sind im einzelnen der G₁/S-Kontrollpunkt, der Restriktionspunkt, der G₂/M-Kontrollpunkt und der Spindelkontrollpunkt.

Dieser seit langem bekannte Zyklus wird von zahlreichen Gliedern (Genen bzw. Regulatorgenen, Regulatorproteinen, Onkoproteinen usw.) reguliert bzw. beeinflusst. Die wichtigsten Regulatoren sind die Zykline (D-Zykline, E-Zykline, A-Zykline und AB-Zykline). Diese jedoch sind wiederum abhängig von übergeordneten Regulationsmechanismen.

In allen Phasen spielt das sog. Retinoblastom-Gen (RB-Gen) in Verbindung mit Phosphorylierungen in allen Aktivitätsabschnitten des Zellzyklus eine wesentliche Rolle.

Die Zykline werden wiederum übergeordnet reguliert durch die Zyklin-dependend-Kinasen (CDK), die wiederum von den Zyklin-dependend-Kinase-Inhibitors (CDK-Inhibitors) bzw. Onkoproteinen p18, p15, p19, p21, p16, p27 usw. beeinflusst werden. Diese Regulationsmechanismen finden vorwiegend in der G₁-Phase des Zellzyklus statt.

Eine Störung dieser Regulationsmechanismen, z. B. der einzelnen Onkoproteine (z. B. p14, p16 usw.), kann entweder zu einer Überregulation führen, wenn die Suppressormechanismen versagen oder zu einer Unterregulation, wenn es zu einer Aktivitätsanreicherung kommt. Ob diese Störung dann zu einer Reparatur führt, an der u.a. das Onkoprotein p53 wesentlich beteiligt ist, oder zum unregelmäßigen Zelltod (Nekrose), zum geregelten Zelltod (Apoptose) oder zum ungebremsten –autonomen, tumorösen - Wachstum führt, hängt von dem Ergebnis des Gesamtregulationsgefüges des Zellzyklus ab.

Im Kontext heißt das, dass genetische Aberrationen auf verschiedenen Ebenen in der Tumorigenese von Karzinomen eine entscheidende Rolle spielen können.

Beim Harnblasenkarzinom sind dies insbesondere vier Chromosomen beteiligt :

1. Chromosom 3 (insbesondere locus 3q)
2. Chromosom 7 (insbesondere locus 7p)
3. Chromosom 17 (17p13 ist der locus für p53)
4. locus 9p21 (kodiert p14 und p16 und beeinflusst damit Rb)

Die genetischen Aberrationen dieser vom Normalen abweichenden DNA-Sequenzen lassen sich durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, die wir vorhin erwähnten, sichtbar machen.

Wie sieht dieses nun im einzelnen aus?

Seit Crick und Watson im Jahr 1953 ist uns der spiralenförmige Aufbau von Chromosomen - die Doppelhelixstruktur der DNA - bekannt. Eine DNA oder

Desoxyribonucleinsäure setzt sich aus Nukleotiden zusammen, die zu verschiedenen Sequenzen zusammengefasst werden bzw. die sich in einem gesetzmäßigen Rhythmus wiederholen. Eine Störung dieser DNA-Sequenzen kann man insofern sichtbar machen, als man ein Pendant zu diesen DNA-Sequenzen „andockt“ und diese „andockende“ DNA-Sequenz mit Fluoreszenzfarben markiert. Wenn man nun die verschiedenen Genaberrationen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, bekommt man für jedes einzelne aberrierte Gen ein unterschiedliches Farbsignal. Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden für das Chromosom C3 rot, für C7 grün, für C17 blau und für 9p21 gold (gelb) benutzt. Da jede normale Zelle jeweils über zwei identische Chromosomensätze verfügt, muß also jede Zelle für jedes Chromosom zwei Signale aufweisen. Das kann man durch die Multicolorfluoreszenz-in situ-Hybridisierung – kurz durch die FISH – sehr gut demonstrieren. Kommt es nun zu einer Überamplifikation dieses Gens, ist also das Gen mehrfach in der Zelle vorhanden, dann haben wir entsprechend mehr Signale (Amplifikation) als normal. Oder - im Gegenteil – bei weniger als zwei Signalen wird von einer Deletion gesprochen.

Der FISH-Test weist also nach, ob ein Gen normal exprimiert, amplifiziert oder deletiert ist.

Diese Veränderungen bilden die Grundlagen für den molekularbiologischen Nachweis von chromosomalen Veränderungen in den Urothelien und damit auch für den **UroVysion-Test** (Folie 18). Auf den Folien 19-25 sind Einzelheiten der FISH-Technik beschrieben. Durch kurze fluoreszenzmarkierte DNA-Sequenzen werden komplementäre Abschnitte in bekannten Zielsequenzen gesucht. Somit können genetische Veränderungen an bestimmten Abschnitten der Gene durch verschiedene Fluoreszenzfarben (z.B. rot, grün, blau und gold) sichtbar gemacht werden. Dabei wird das Zentromer des Chromosomen 3 mit einem roten, das Zentromer des Chromosomen 7 mit einem grünen, das Zentromer des Chromosomen 17 mit einem blauen und der Locus 9p21 des Chromosomens 9 mit einem gelben bzw. goldfarbenen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Da jedes Gen mit zwei Allelen in einem normalen Kern enthalten ist, müssen entsprechend auch normalerweise zwei rote, zwei grüne, zwei gelbe und zwei blaue Signale in einem Zellkern aufleuchten. Abweichungen von diesem Normalbefund werden als Zunahme (Amplifikationen /Polyploidien) oder als Verlust (Deletionen) sichtbar gemacht.

Der kurz gefaßte Arbeitsablauf des Urovysion-Testes geht aus der Folie 24 hervor :

1. Zellen aus dem Urin auf einem Objektträger fixieren
 - ☒ z.B. über Cytospin-Zentrifuge
2. Vorbehandlung und Hybridisierung
 - ☒ Proteaseverdau und Dehydrieren (Alkoholreihe)
 - ☒ DNA-Sondenmix zugeben und inkubieren
 - ☒ DAPI Gegenfärbung
3. Interpretation der Ergebnisse
 - ☒ Auswertung von 25 malignen Zellen
 - ☒ Laut Kriterien gelten z.B. ≥ 5 Zellen mit mehr als einem zusätzlichen Chromosom als FISH +

In der Folie 25 sind sowohl normale Zellkerne mit einem diploiden Chromosomensatz der dargestellten Centromere (also jeweils zwei gleichfarbene

Signale für C3, C7, C17 und für 9p21) auch Tumorzellkerne mit chromosomalen Aberrationen (in diesen Zellkernen mehr als nur zwei Signale pro Centromer bzw. Polyploidie oder weniger als zwei Signale, d.h. Deletion) enthalten.

Die Folien 26 und 27 zeigen, wie durch den Urovysion-Test zytologisch-differentialdiagnostisch schwierige Urinsedimente besser charakterisiert und diagnostiziert werden können.

Wie bereits in der Folie 10 beschrieben, zeigt die Folie 28 – etwas abstrahiert – molekularpathologische Befunde bei Oberflächenkarzinomen und invasiven Karzinomen. In Oberflächenkarzinomen wird zumeist eine Aberration bzw. Deletion des Locus 9p/21 und in invasiven Karzinomen Aberrationen im Bereich der Chromosomen 3, 7 und 17 beobachtet. Dieser Sachverhalt ist in den Folien 29 und 30 ausgewiesen.

In den Folien 31 und 32 sind die Zuwächse vor allem der Sensitivität der Urinzytologie durch den hinzugekommenen FISH-Test (Urovysion-Test) anhand von drei Studien aufgeschlüsselt. In allen untersuchten Kategorien der verschiedenen differenzierten Urothelkarzinome bzw. in jedem Fall erhöht der Urovysion-Test die Sensitivität der konventionellen Urinzytologie.

Mit dem Urovysion-Test sollen in der Nachsorge von Tumorpatienten/innen frühe Stadien von Harnblasentumoren (vorwiegend Verlust von Chromosomen 9p21 einerseits und andererseits aggressive Tumore herausgefunden werden, wobei sich letztere zumeist durch polyploide Veränderungen der untersuchten Genabschnitte auszeichnen.

In der Folie 34 ist ein Algorithmus aufgezeichnet, aus dem die Weichenstellung hervorgeht, die dem Urovysion-Test (sog. Multicolor-Urovysion-Test bzw. FISH-Test) zukommen kann:

Bei Zustand nach Harnblasenkarzinom können mittels des FISH-Testes – etwas überzeichnet dargestellt – die Befunde bzw. die Tumore in zwei Kategorien eingeteilt werden. Einerseits in die bereits mehrfach angesprochene Low-risk-Gruppe, die sich durch eine mehr oder weniger stabile Genetik, guten Differenzierungsgrad, langsames Tumorwachstum und niedrigere Rezidivrate auszeichnet.

Die andere Gruppe, d.h. die High-risk-Gruppe zeichnet sich durch hochmalignes Tumorwachstum (pTaG3) und durch das Carcinoma in situ aus, das in der Regel als TisG3-Tumor diagnostiziert wird. Die Tumoren dieser Gruppe gehen in der Regel relativ früh in invasives Wachstum und letztlich in muskelinvasive Tumore über. Diese Tumore zeichnen sich durch eine genetische Instabilität aus.

Zusammenfassung (Folie 35) :

An der Karzinogenese von Blasentumoren können eine ganze Reihe von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen beteiligt sein. Das Zusammenspiel dieser Faktoren führt zu Tumorentstehung, Fortschreiten des Tumors und schließlich zur Metastasierung:

1. Chromosomale Aberrationen führen zur Initiation der Karzinogenese
2. Verlust der Zellzyklusregulation führt zur Zell- bzw. Tumorpheriferation
3. Verlust der Zelladhäsion führt zur Metastasierung

Zu den Onkogenen, die am Blasenkarzinom beteiligt sind, zählen u. a. das cH-ras, c-myc und zahlreiche Regulatorgene der Gruppe der Cycline, der Cyclin-Inhibitoren und deren übergeordnete Regulatorgene. Das Gen 13q14 – auch Retinoblastom genannt – spielt in fast allen Phasen des Zellzyklus und der Tumorigenese eine Schlüsselrolle.

In vorausgegangenen Studien (u.a. Bubendorf et al 2001) ließen sich mit Hilfe des Urovysion-Testes dreimal mehr pTa-Tumoren - verglichen mit der Zytologie - nachweisen. Im Vergleich der Sensitivitäten von Blasenspülflüssigkeiten und Urinzytologien (Spontanurin) erwiesen sich die Blasenspülflüssigkeiten als sensitiver. Es konnte eine Steigerung der Sensitivität für alle invasiven Tumoren (pT1-4) auf 100 % festgestellt werden, während die konventionelle Zytologie nur ca. 2/3 dieser Tumore erfasste. Hier ist der FISH-Test der Zytologie weit überlegen, da in der reinen Zytologie von Urin- oder Blasenspülflüssigkeiten reaktive urotheliale Veränderungen sehr oft nicht von gut differenzierten neoplastischen Urothelien abgegrenzt werden können.

Bei Patienten mit negativen Nachsorgezytologien, die jedoch in dem FISH-Test positiv reagierten, konnte ein Tumorrezidiv wahrscheinlich gemacht werden, das in der Regel frühestens ca. nach sechs bis neun Monaten entstehen kann.

Demgegenüber ist in Nachsorgezytologien von FISH-negativen Fällen auch noch nach sechzehn bis neunzehn Monaten kein Rezidiv aufgetreten.

Mit Hilfe des Urovysion-Testes können Hinweise auf „low grade“ und „high grade“-Tumoren insofern gezogen werden, als ein Verlust von 9p21 ohne weitere Polyploidie für ein low grade-papilläres Karzinom (pTaG1/G2) spricht, während die Vermehrung von CEP3, 7 und 17 eher auf die „high grade-Tumoren“ (pT1-4) hinweist.

Facit für die Klinik:

In der Nachsorge von Harnblasentumoren bei negativer Zytologie entscheidet der FISH-Test über das weitere Procedere:

FISH-negative Kontrollen werden in die low risk-Gruppe mit längeren Zystoskopien-Intervallen eingruppiert.

FISH-positive Fälle werden als high risk-Gruppe eingeordnet und kürzerfristig zystoskopiert.

Vor allem die **relativ geringe Sensitivität** und Spezifität der zytologischen Diagnostik von Harnblasenkarzinomen lässt sich **durch die oben genannte Methode der molekularen Nachweismethode (UroVysion) deutlich erhöhen.**

Anmerkung (Folie 36 – 37) :

Den Mitarbeiterinnen der Firma Abbott – insbesondere den Damen Frau Dr.med. Dipl. biochem. Patricia Geller und Frau Spauke danke ich sehr für die freundliche Überlassung der Vorlagen zu den Folien 7 - 10, 18 – 23, 25 – 27, 29 – 33 und zu der Folie 35. Frau Dr.med.vet. Katrin Henneicke danke ich sehr für die molekularpathologischen Untersuchungen, ihre Hilfsbereitschaft, vertrauensvolle Zusammenarbeit und uneingeschränkte Kooperation (s.auch Folie 36 der Präsentation).

