

# Neue molekularpathologische Untersuchungen zur Früherkennung und Verlaufskontrolle des Harnblasenkarzinoms (UroVysion)

Prof.Dr.med. Klaus Richter

[www.pathologie-richter.de](http://www.pathologie-richter.de)

eMail: richter@pathologie-richter.de

# Diagnostik des Harnblasenkarzinoms in der Pathologie

1. Makroskopie  
(inkl. Sonographie etc.)
2. Histologie
3. Zytologie  
konventionell  
Dünnschichtzytologie
4. Immunhistologie/-zytologie
5. DNA-Zytometrie
6. Molekulare Nachweismethoden  
(FISH /UroVysion)

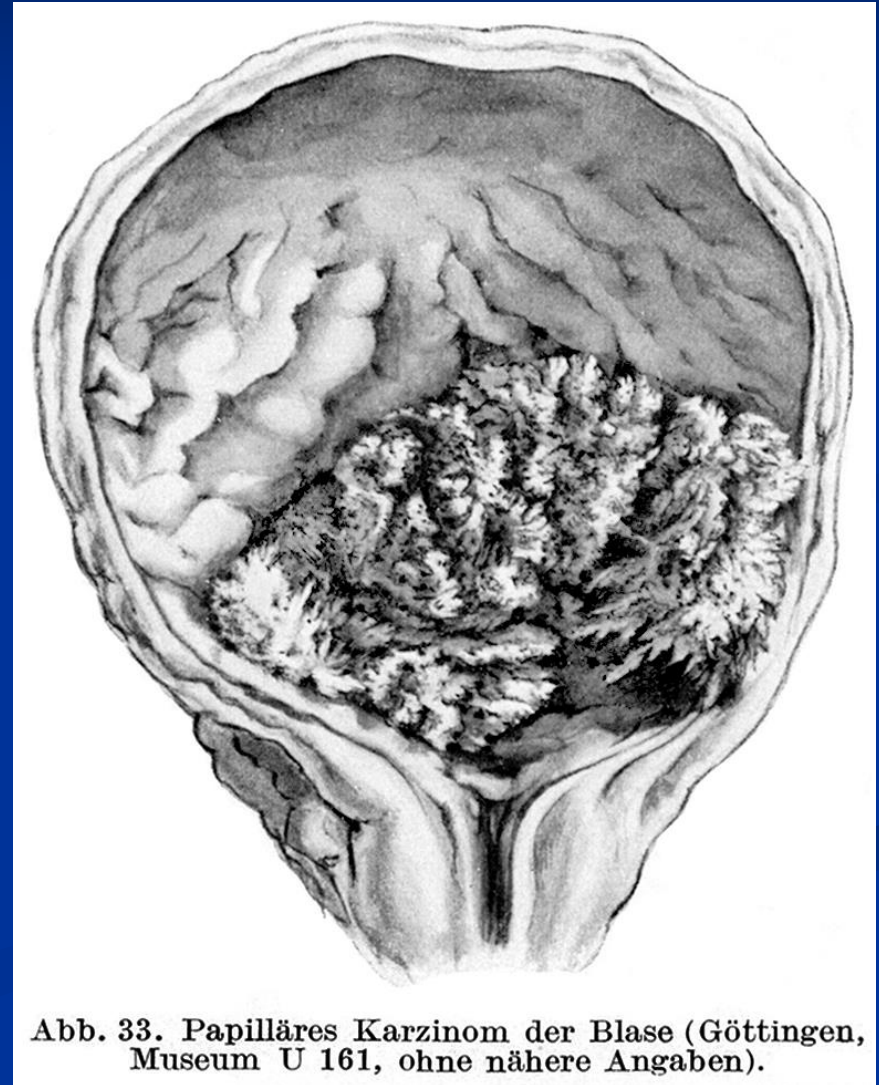
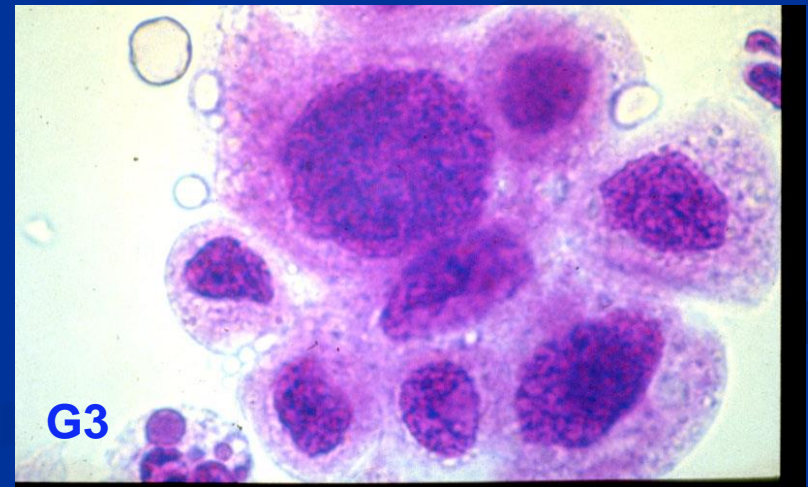
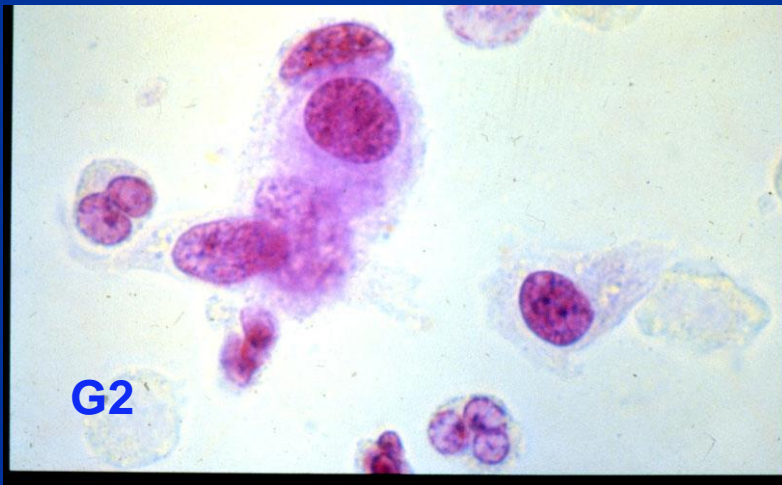
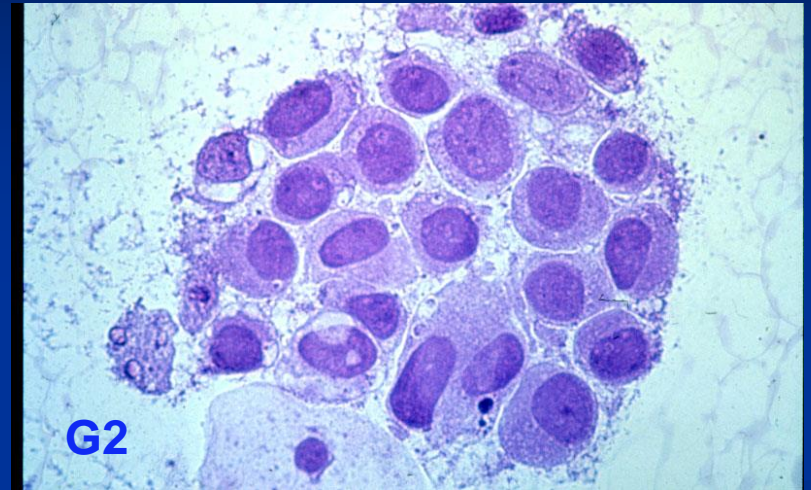
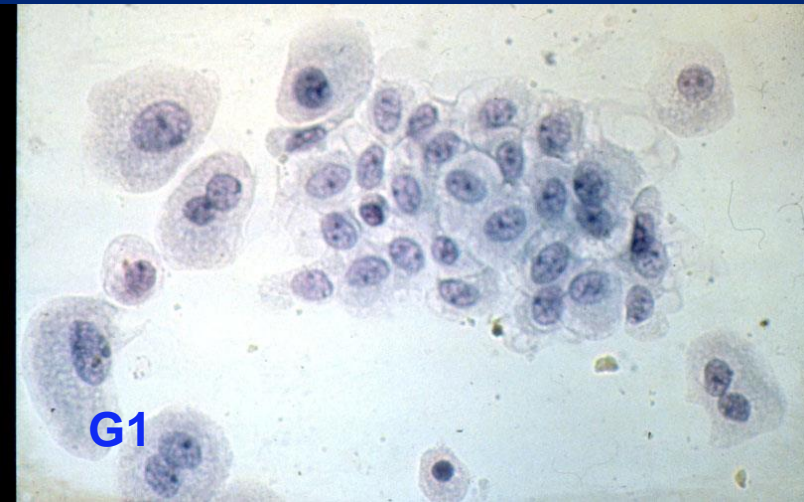


Abb. 33. Papilläres Karzinom der Blase (Göttingen, Museum U 161, ohne nähere Angaben).

# Harnblasenzytologie



# Characteristics of Malignant Neoplasms

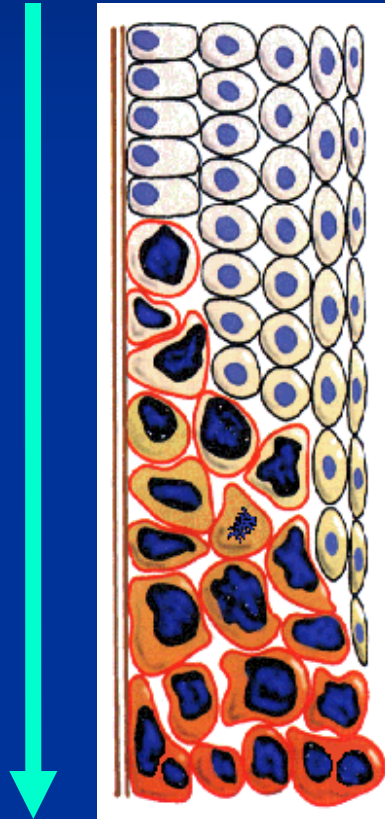
WELL  
DIFFERENTIATED

Low Proliferation

Normal  
DNA Content

Normal  
Adult Cell  
Markers

Sensitive to  
Apoptosis &  
Chemotherapy



Elevated Proliferation

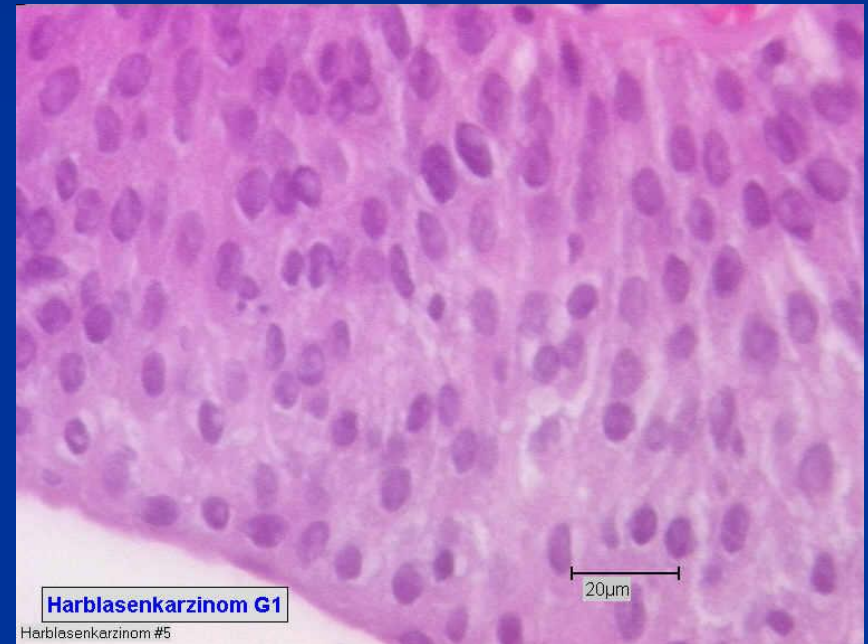
Aneuploid  
DNA Content

Abnormal  
or Fetal  
Markers

Resistant to  
Apoptosis &  
Chemotherapy

POORLY  
DIFFERENTIATED

# Gut differenziertes intraepitheliales papilläres Urothelkarzinom pTaG1



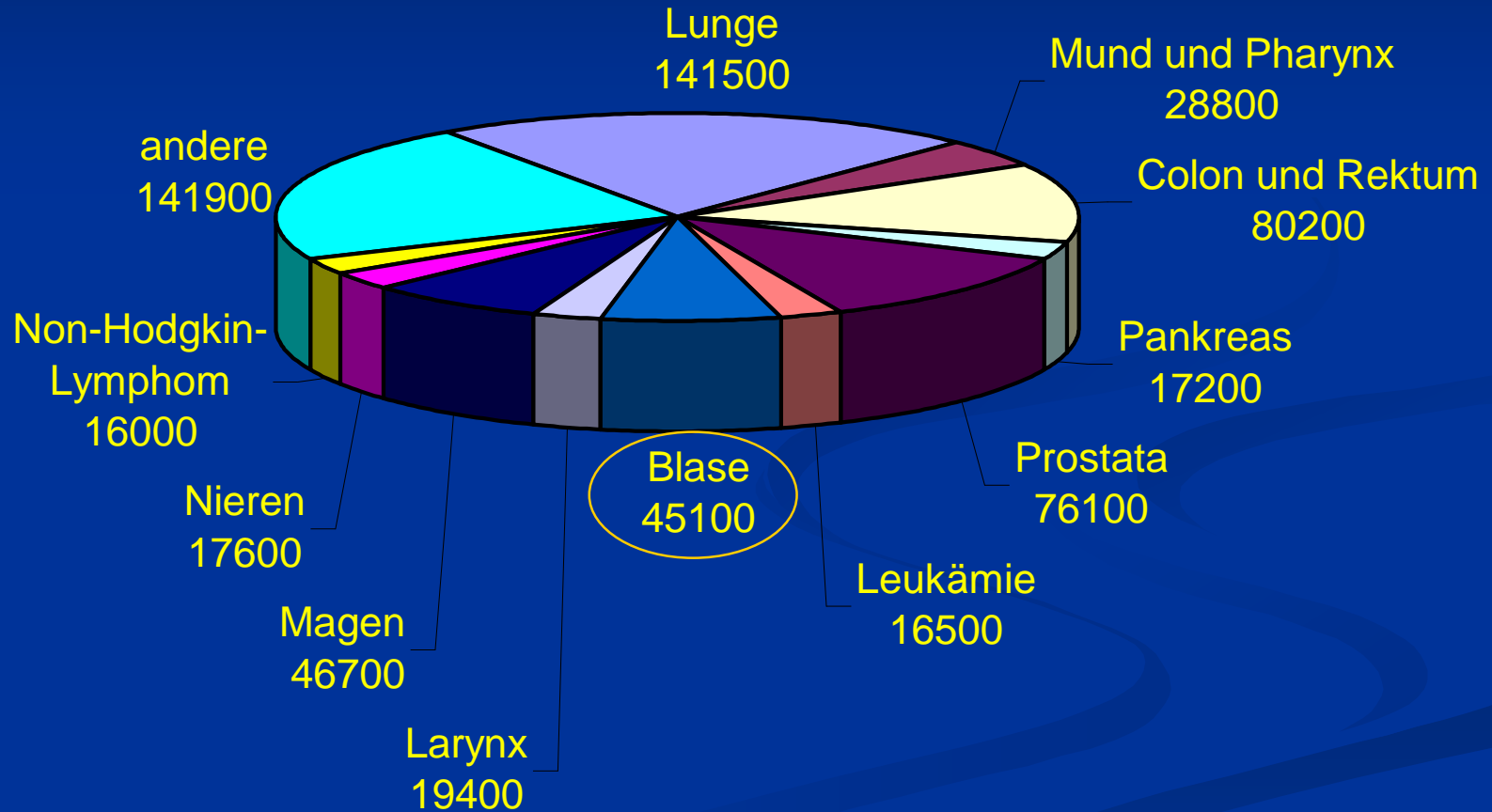
# Gut differenziertes intraepitheliales Harnblasenkarzinom pTaG1



# Sensitivität in der Zytologie von Harnblasenkarzinomen

	Hailing et al. 2000		Bubendorf et. al 2001		Sarosdy et al. FDA Zulassungsstelle	
	n	Zyto%	n	Zyto%	n	Zyto%
pTa	37	47	45	24	32	28
pTis	18	78	-	-	7	33
pT1-4	19	60	25	68	9	50
G1	11	27	21	14	22	18
G2	25	54	29	41	9	44
G3	37	71	17	76	18	41
Gesamt	73		67		49	

# Anzahl der Neuerkrankungen in Europa

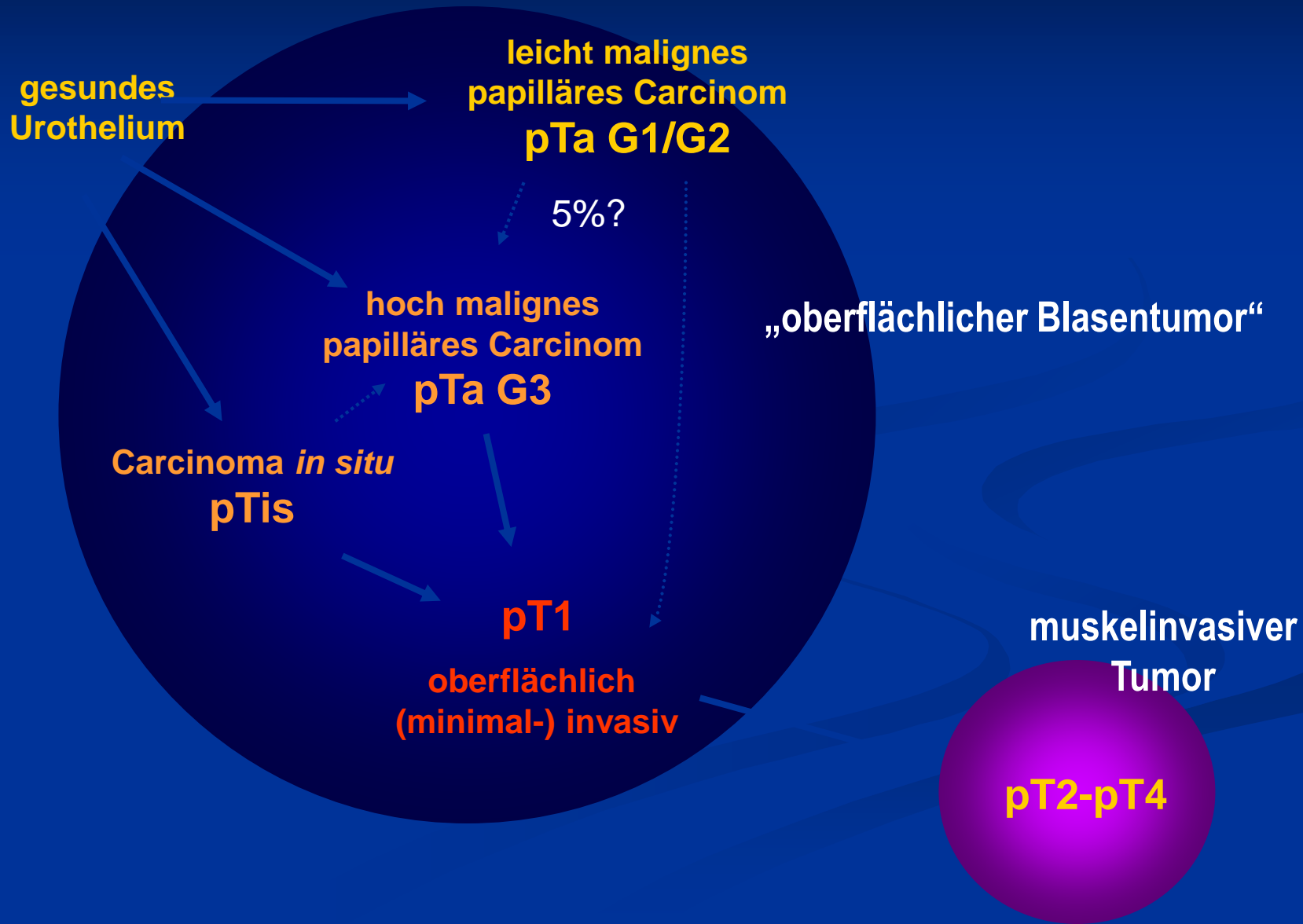




# Häufigkeit des Harnblasenkarzinoms

- **50 000 neue Patienten und 10 000 Todesfälle pro Jahr (USA)**
  - Prävalenz von 500 000 – diagnostiziert, behandelt, in Remission
  - 5. häufigster Tumor, in Deutschland: 13 000 Neuerkrankungen pro Jahr (20 000 Verdachtsdiagnosen)
- **Hohe Rezidiv-Rate**
  - 65% Rezidiv-Rate (5 Jahre)
  - 15- 30% Progressionsrate
- **10-15% aller Fälle werden als Carcinoma In Situ (CIS) diagnostiziert**

# Klinische Progression von Blasen Tumoren



# Harnblasenkarzinome

sind

- Chromosomale Erkrankungen
- entstanden durch eine Deregulierung des normalen Zellzyklus
- Deregulierung von Proliferation und Apoptose  
(auf Zellebene geregelter Zelltod )

# Normaler Zellzyklus

**Interphase:**

**G0 = Ruhephase**

**G1 = relative Ruhephase**

**G2 = RNA-Synthese-Phase**

**S = DNA-Synthese-Phase**

**Mitose:**

**M = Mitosephase (aktive Zellteilung)**

# GENE TARGETS IN NEOPLASIA

**PROTO-ONCOGENES**  
(ca. 200)

**Mutatorgenes**

**TUMOR SUPPRESSOR  
GENES (ca.50)**

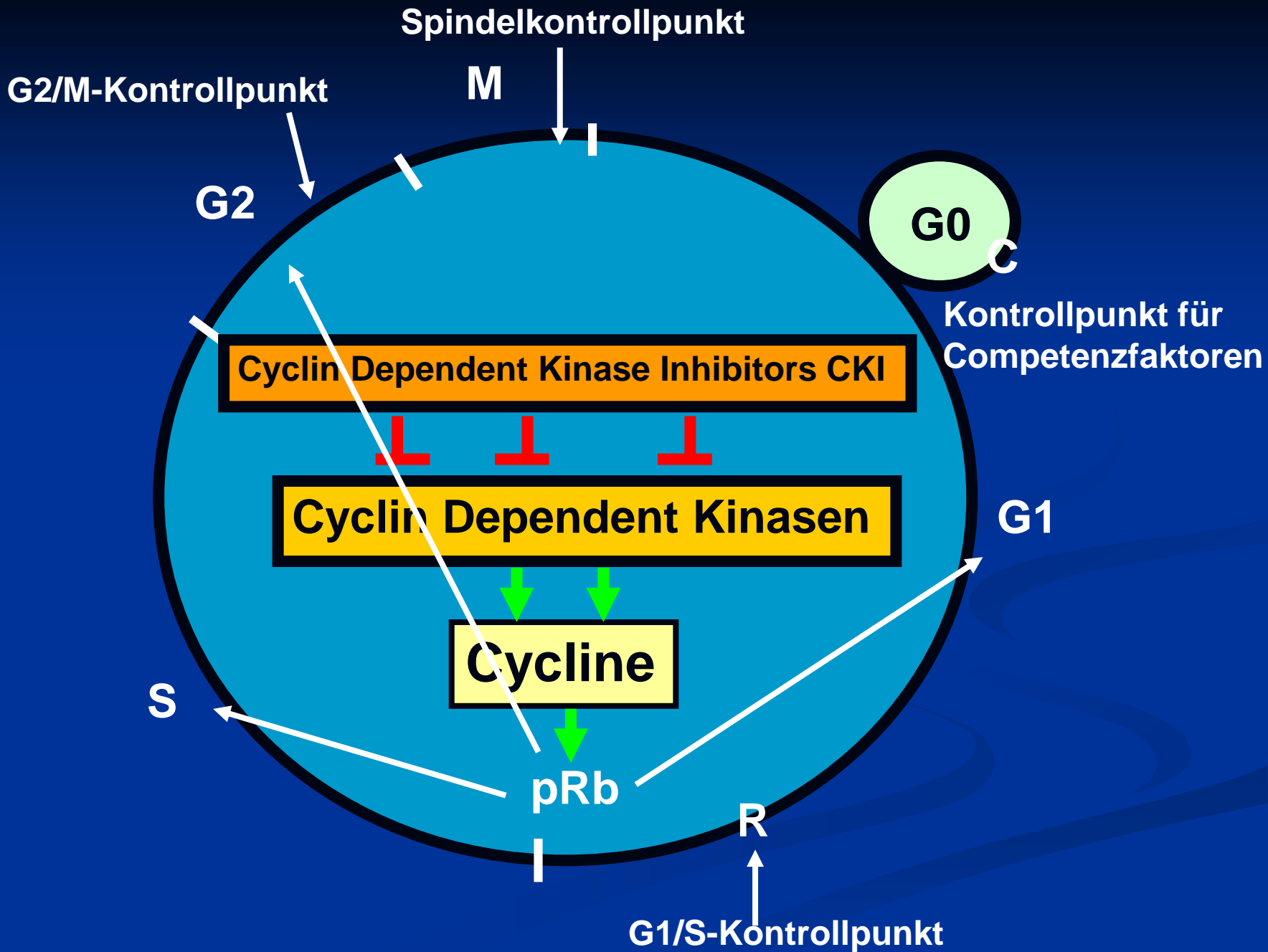
Mutations  
Activate

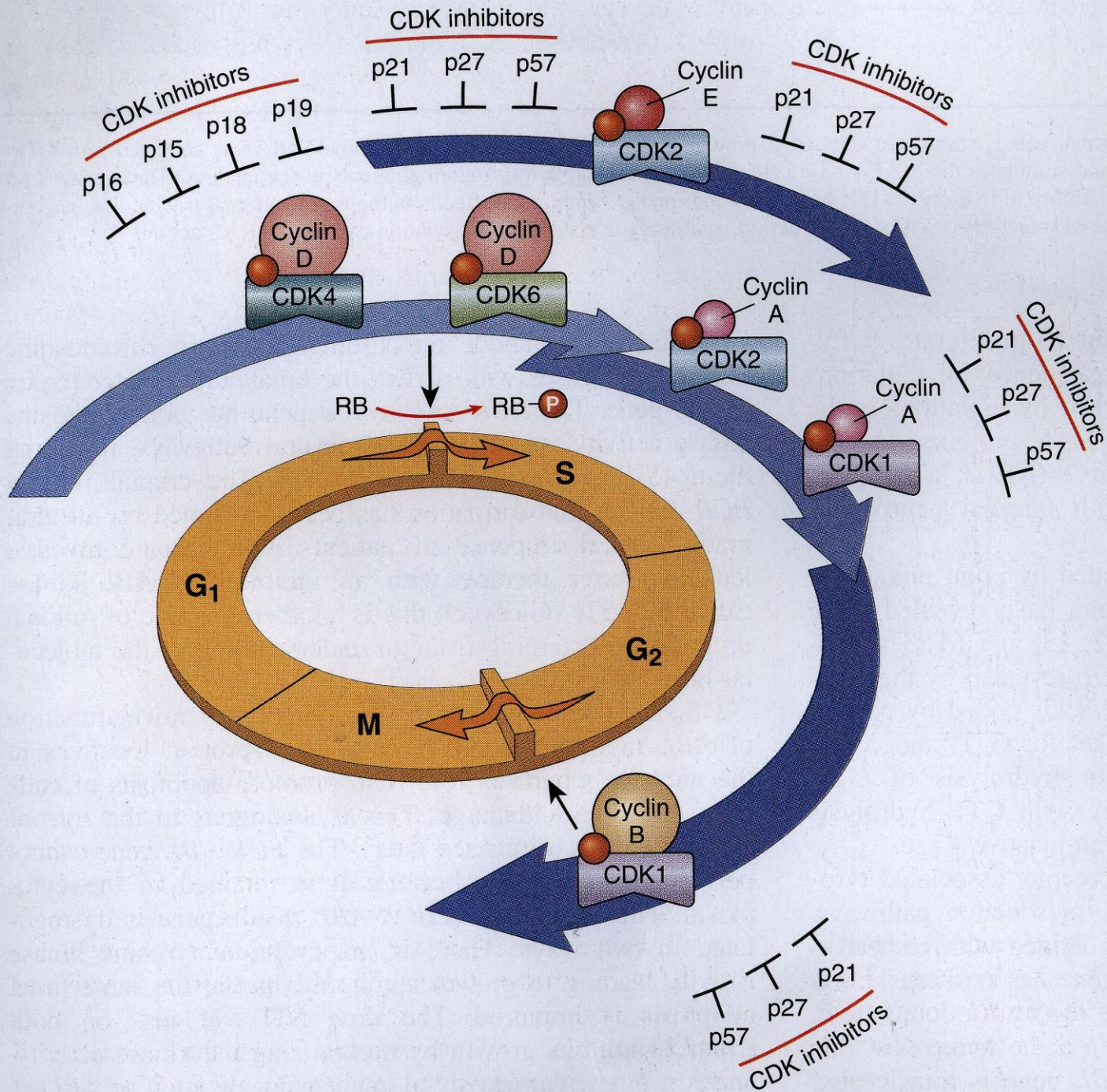
- dominant
- gain activity

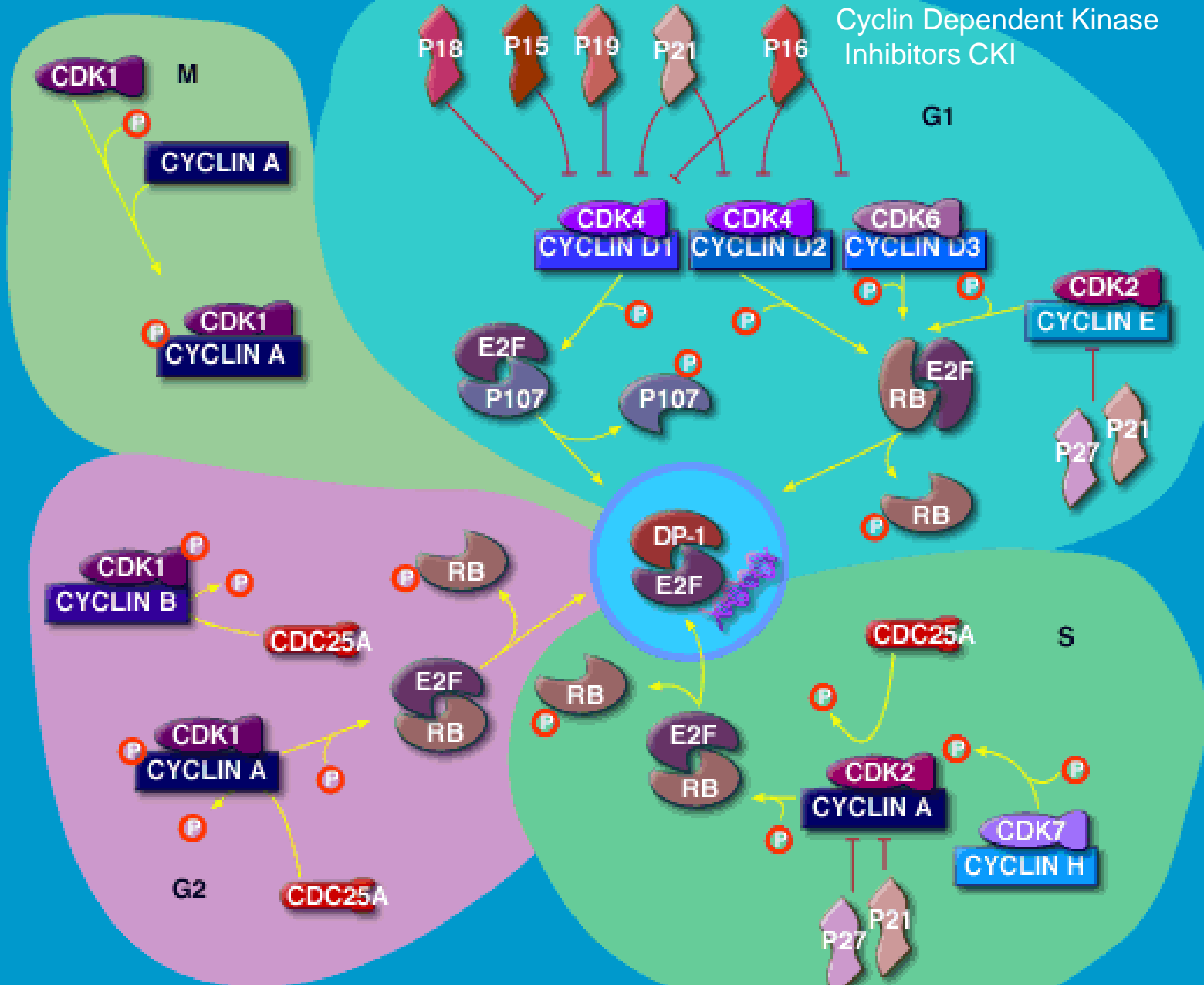
Mutations  
Inactivate

- recessive
- loss of activity

DNA REPLICATION  
and  
CELL PROLIFERATION

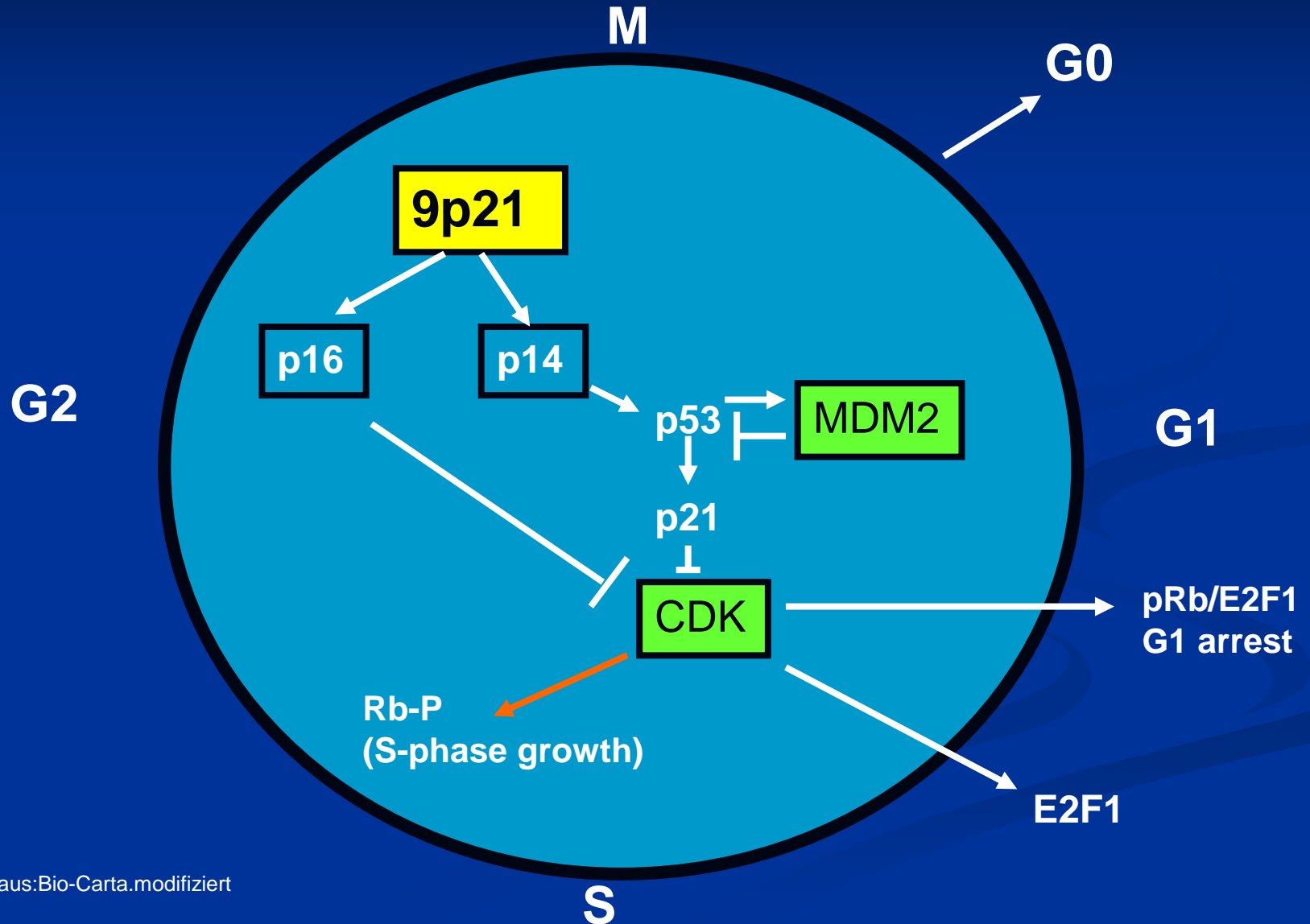








# Rolle des 9p21 locus (INK4a/ARF) in der Regulation des Zellzyklus



# ***Grundlagen der FISH-Detektion von Blasen Tumoren in Urin***

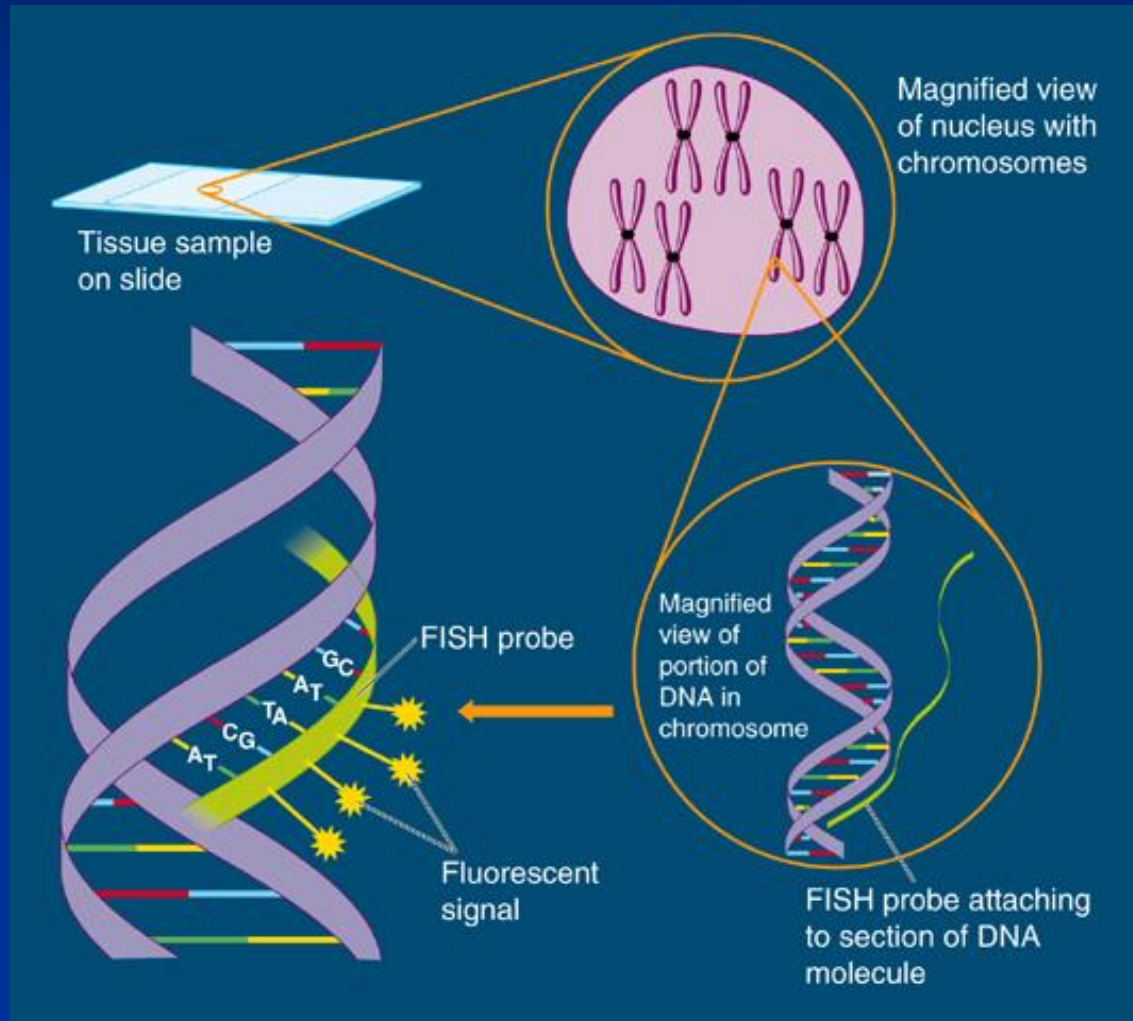
- Urothelcarcinome (wie andere solide Tumore) werden durch viele chromosomale Anomalitäten (z.B. Aneuploidien, Rearrangements, Deletionen, Genamplifikationen) charakterisiert
- Urothelzellen (besonders UC-Zellen) werden leicht in den Urin abgeschilfert
- deshalb kann FISH die abgegebenen UC-Zellen im Urin UC-Patienten detektieren

# *FISH*

## Fluoreszenz-*In Situ*-Hybridisierung

Bei dieser molekularbiologischen Technik werden fluoreszenz-markierte DNA-Sonden genutzt, um eine bestimmte Zielsequenz (z.B. Gen) in der DNA im Zellkern sichtbar zu machen

# FISH - Überblick

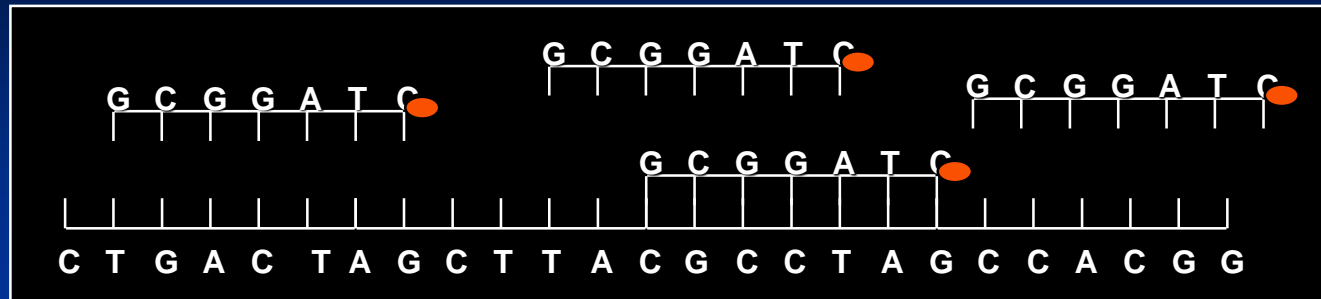


# FISH-Sonden

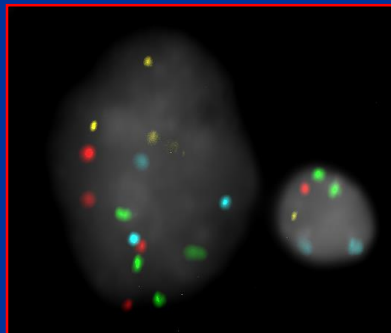
- kurze, fluoreszenzmarkierte DNA Stücke, die komplementär zu bestimmten Abschnitten (Loci) der Ziel-DNA sind
- als Ziel-DNA können Gene, Chromosomenabschnitte oder ganze Chromosomen dienen
- **Detektion genetischer Veränderungen an einem bestimmten Locus**
- **„moderne“ Färbungen zum Nachweis chromosomaler Veränderungen, die auf Tumore hinweisen**



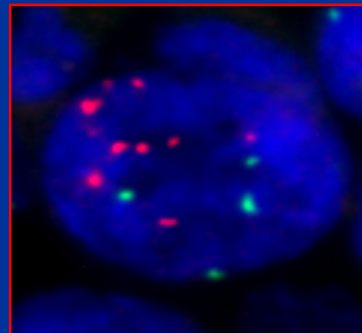
# DNA-Sonden



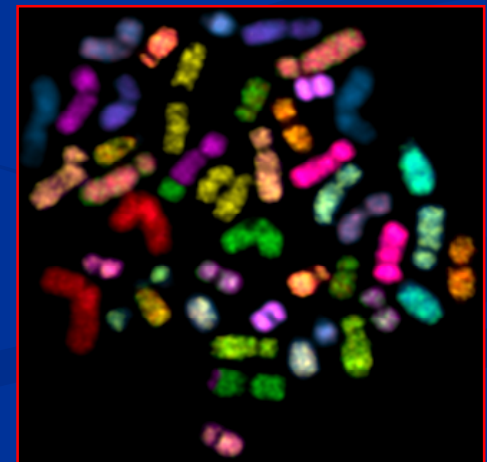
Detektion einzelner DNA-Einzelstrangabschnitte mit fluoreszenz- markierten Einzelstrangsonden



Blasentumorzellen  
aus Urinzytologie

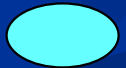
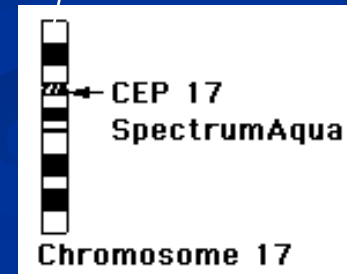
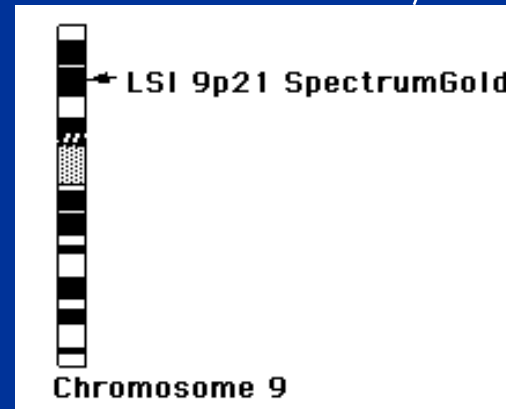
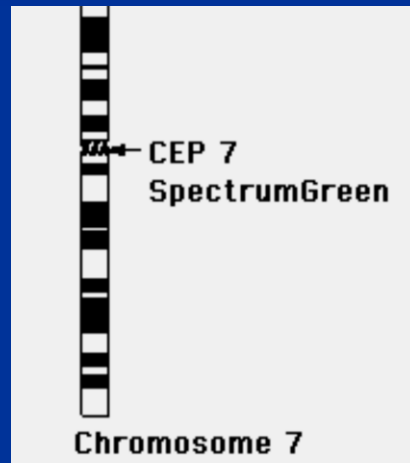
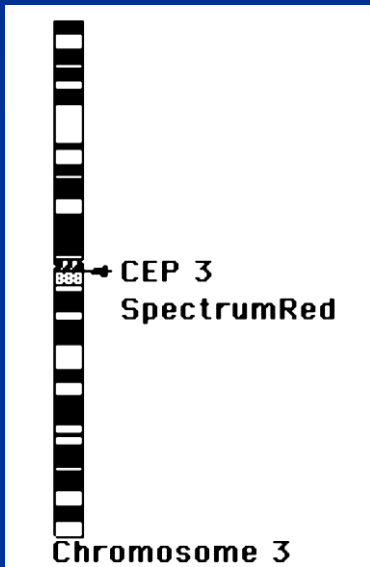
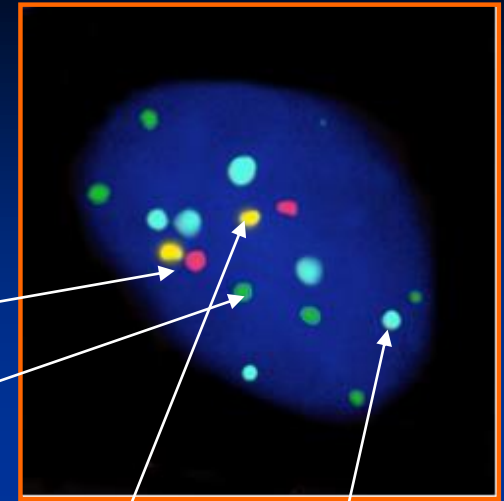


Her2- Amplifikation in  
Brustkrebszellen



M-FISH

# UroVysion-Test



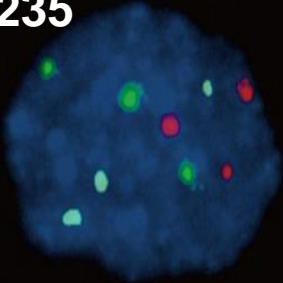
# Arbeitsablauf UroVysion

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.  $\geq 5$  Zellen mit mehr als einem zusätzlichen Chromosom als FISH +

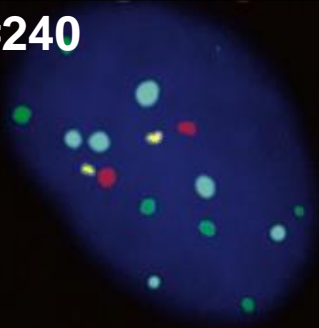


# Beispiele von "anormalen" und normalen Zellen aus Urin

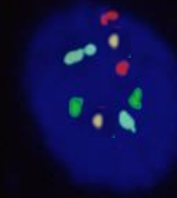
Patient  
#235



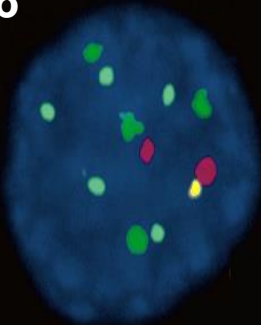
Patient  
#240



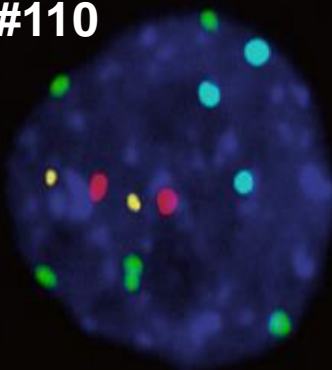
Normal  
Donor



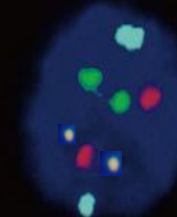
Patient  
#66



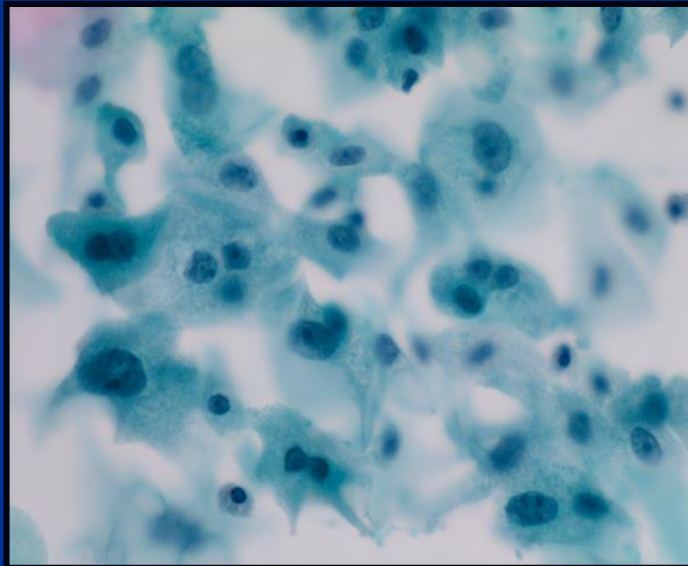
Patient  
#110



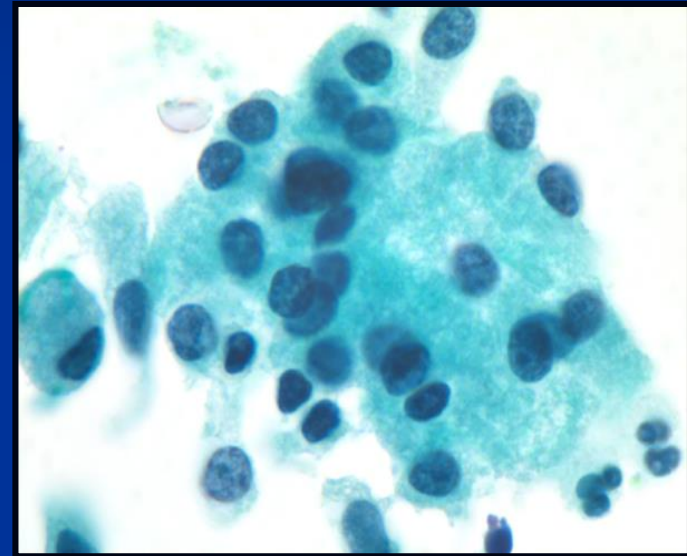
Normal  
Donor



# UroVysion™ FISH von Patienten in Verlaufskontrolle

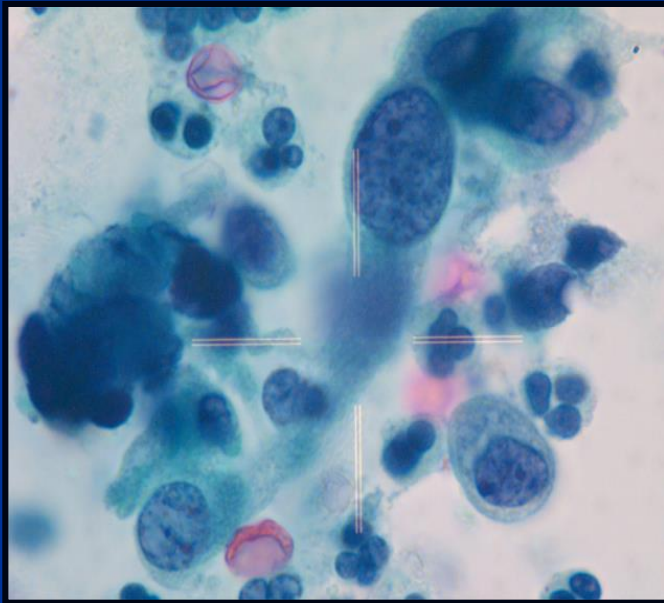


**FISH pos**  
(17/25)

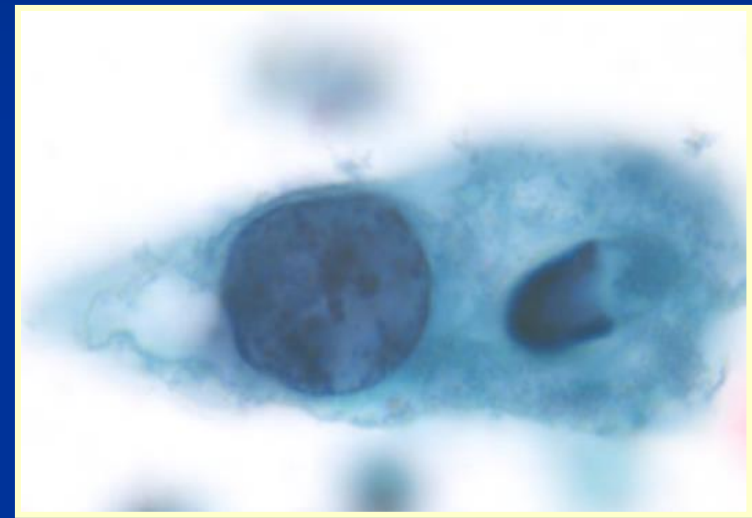


**FISH neg**

# UroVysion™ FISH in urothelialen Atypien ohne sichere Bestimmbarkeit



**FISH neg**  
Ureterstein



**FISH pos (5/25)**  
Tumorthherapie

## Überwiegende Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen in Abhängigkeit von der Tumordifferenzierung

Chromosom	Oberflächenkarzinom	Invasive Karzinome
9/p21	+	
3		+
7		+
17		+
Rb		+
p53		+
p14, p16		+

# Cytogenetische Progression von Blumentumoren

normales  
Urothelium

→ pTa  
G1/G2

- genetisch stabil
- wenig genetische Änderungen
- (peri-)diploid
- niedriges Progressionsrisiko

→ pTa G3  
pT1  
pTis

- genetisch instabil
- Veränderungen von allen Chromosomen
- polyploid
- Genamplifikationen
- hohes Progressionsrisiko

# genetisch stabile Tumore

früh

später

pTa  
G1/G2



gesundes  
Urothelium



pTa G3  
pT1  
pTis



später

pT2- pT4

# genetisch instabile Tumore

# Vergleich Sensitivität und Spezifität bei Cytologie und FISH

	Halling et al. J Urol 2000			Bubendorf et al. Am J Clin Pathol 2001			Sarosdy et al. FDA Zulassungsstudie		
	n	Cyto [%]	FISH [%]	n	Cyto [%]	FISH [%]	n	Cyto [%]	FISH [%]
<b>Sensitivität</b>									
pTa	37	47	65	45	24	73	32	28	69
pTis	18	78	100	--	--	--	7	33	100
pT1-pT4	19	60	95	25	68	100	9	50	92
G1	11	27	36	21	14	71	22	18	55
G2	25	54	76	29	41	86	9	44	78
G3	37	71	97	17	76	94	18	41	94
insgesamt	73	58	81	67	42	84	49	34	76
N	265			117			176		
<b>Spezifität</b>									
insgesamt	78	98	96	33		97	275		95

# Vergleich der Sensitivität Zytologie und FISH (nach Bubendorf et al)

Urin		N (%)		
	n Proben	Zytologie	FISH	kombiniert
BPH	27	3 (11)	1 (4)	4 (15)
pTa	45	11 (24)	33 (73)	35 (78)
pT1	12	6 (50)	12 (100)	12 (100)
pT2-4	13	11 (85)	13 (100)	13 (100)

Tabelle aus: Bubendorf et al: Multiprobe FISH for Enhanced Detection of Bladder Cancer in Voided Urine Specimens and Bladder Washings. Am J Clin Pathol 2001; 116: 79-86



# *Was soll UroVysion nachweisen ?*

- **frühe Stadien von Blasen Tumoren  
(Verlust von Chromosom 9p)**
- **aggressive Arten, charakterisiert  
durch ploide chromosomale  
Veränderungen**

Zystoskopisch nachgewiesener  
und resezierter Tumor

3-monatige Zystoskopie

kein Tumor/  
zytol. G0-2

kein Tumor/  
zytol. G3

**FISH**

FISH **negativ**

FISH **positiv**

**high risk**  
**reguläre Zystoskopie-**  
**Intervalle**

**low risk**  
**Längere Zystoskopie-**  
**Intervalle**

# *Zusammenfassung*

- **UroVysion™ Multisonden-FISH erhöht die Sensivität der nicht-invasiven Detektion von Blasen Tumoren in Urinproben beträchtlich**
  - hohe Sensitivität für pTis, pT1-pT4, pTaG3
  - Sensitivität geringer bei pTaG1/G2
- **FISH ist ein vielversprechendes Werkzeug für die nicht-invasive Überwachung von Blasen tumor-Patienten.**

**Neue molekularpathologische Untersuchungen  
zur Früherkennung und Verlaufskontrolle des  
Harnblasenkarzinoms (UroVysion)**

**Prof.Dr.med. Klaus Richter**

**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**

Prof.Dr.med.K.Richter

[www.pathologie-richter.de](http://www.pathologie-richter.de)

eMail: richter@pathologie-richter.de

# Neue molekularpathologische Untersuchungen zur Früherkennung und Verlaufskontrolle des Harnblasenkarzinoms (UroVysion)

Prof.Dr.med. Klaus Richter

**Vielen Dank für Ihr Interesse und für Ihre  
Aufmerksamkeit**

Prof.Dr.med.K.Richter

[www.pathologie-richter.de](http://www.pathologie-richter.de)

eMail: richter@pathologie-richter.de