



Früherkennung von Harnblasenkrebs

Automatisierte Fluoreszenzanalyse chromosomaler Aberrationen im Urin

Heiko U. Käfferlein, Christina U. Köhler, Laura Martin, Nadine Bonberg, Thomas Behrens, Thomas Brüning

Harnblasenkrebs gehört zu den weltweit am häufigsten diagnostizierten Krebsarten. Neben dem individuellen Rauchverhalten ist vor allem der berufliche Umgang mit aromatischen Aminen ursächlich für die Entstehung von Harnblasenkrebs. Auch heutzutage stellen aromatische Amine wichtige Start- und Zwischenprodukte in der chemischen Industrie dar, zum Beispiel bei der Herstellung von Kunststoffen sowie von Farb- und Arzneimitteln. Neben der Primärprävention haben daher auch Fragestellungen aus dem Bereich der Sekundärprävention von Harnblasenkrebs einen hohen Stellenwert in der arbeits- und betriebsmedizinischen Forschung. Das IPA beschäftigt sich im Rahmen seiner Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Entwicklung effizienter Biomarker mit der Etablierung neuer beziehungsweise Weiterentwicklung vorhandener Früherkennungsmaßnahmen von Harnblasenkrebs.

Harnblasenkrebs zählt in den Industrienationen zu den bedeutendsten Krebserkrankungen. In Deutschland treten nach Angaben des Robert-Koch-Instituts etwa 29.000 Blasenkrebsfälle pro Jahr auf; Männer sind dabei etwa dreimal so häufig betroffen wie Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit oberflächlichen, lokal begrenzten Harnblasenkarzinomen beträgt nahezu 80 Prozent (Siegel et al., 2012). Während oberflächliche Tumoren nicht akut lebensbedrohlich sind, steigt mit dem Eindringen des Tumors in die Muskelschicht der Blase das Risiko einer möglichen Todesfolge. Da sich alle oberflächlichen Blasentumoren durch eine etwa 70 Prozent hohe Rezidivrate auszeichnen, ist eine regelmäßige Nachsorge nach der Entfernung von Ersttumoren zur Vermeidung eines progressiven Krankheitsverlaufs essenziell.

Potenzial Biomarker-basierter Ansätze bisher wenig genutzt

Für Harnblasenkrebs gibt es in Deutschland bislang kein etabliertes und anerkanntes Screeningverfahren. Als diagnostisches Instrument im Verdachtsfall von Harnblasenkrebs wird derzeit standardmäßig die Zytologie durchgeführt. Diese besitzt jedoch eine geringe Sensitivität (Halling et al., 2000). Die Abklärung eines positiven zytologischen Befundes erfolgt durch die Blasen Spiegelung, die auch in der Nachsorge von Harnblasenkrebspatienten in drei- bis sechsmonatigen Abständen über zwei Jahre zur Früherkennung

eines Rezidivs angewendet wird. Problematisch an der Blasen Spiegelung ist dabei nicht nur die Schmerzhaftigkeit für den Patienten – sie übersieht auch oft flache und aggressive Tumore wie In-situ-Karzinome, die nur schwer von einer Entzündung zu unterscheiden sind. Ein klinisch etablierter Biomarker könnte bei regelmäßiger Erfassung die schmerzhaften Blasen Spiegelungen auf solche Fälle reduzieren, in denen der Marker auffällig war. Da Urin aufgrund seines direkten Kontaktes zum Zielorgan und seiner leichten Zugänglichkeit die ideale Matrix für solche Biomarker darstellt, wird auf den verschiedensten molekularen Ebenen nach einem solchen Marker gesucht.

Nachweis chromosomaler Aberrationen – der UroVysion™-Test

Das Blasenkrebs-Genom ist gegenüber dem gesunden Urothel stark verändert, was sich unter anderem in der Veränderung der Anzahl einzelner oder mehrerer Chromosomen beziehungsweise Chromosomen-Abschnitte äußert (Knowles, 2008). So ist der Chromosomensatz bei gesunden Menschen diploid, das heißt ein Chromosom ist jeweils zweifach vertreten. Bei Blasenkrebs treten zunehmend Abweichungen von diesem diploiden Chromosomensatz auf, die mit Hilfe der sogenannten Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (kurz FISH) unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden können. Zu diesem Zweck werden Chromosomen mit fluo-

reszierenden Farbstoffen markiert und gleichzeitig die Zellkerne der Urinzellen eingefärbt. Harnblasentumorzellen zeichnen sich durch mehrfaches Vorliegen der Chromosomen 3, 7 und 17 und/oder durch den Verlust des Tumorsuppressor-Gens p16 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (9p21) aus (Sokolova et al., 2000). Auf Basis dieser Veränderungen entwickelte die Firma Abbott ein nicht-invasives Test-Kit für die unterschiedliche FISH-Färbung dieser Chromosomen im Urinsediment, den sogenannten UroVysion™. Der Test zeigte in initialen Studien bei ähnlicher Spezifität eine höhere Sensitivität als die Urinzytologie (Halling et al., 2000; Skacel et al., 2003) und erhielt durch die Food and Drug Administration (FDA) in den USA 2001 zunächst die Zulassung für die Rezidivdiagnostik und 2005 schließlich auch die Zulassung zur Erstdiagnose von Harnblasenkrebs.

Uro-Vysion™ – Auswerter-abhängig

Beim UroVysion™ werden, ähnlich der Urinzytologie, bereits morphologisch auffällige Kerne des Urinsediments untersucht. Die Auswertung erfolgt nach einem strengen Algorithmus und der Test gilt als positiv, wenn nach Auswertung von 25 morphologisch auffälligen Zellen in mindestens vier der Zellkerne zwei der drei Chromosomen 3, 7 und 17 vermehrt auftreten (>2 Signale) beziehungsweise bei mindestens 12 Zellkernen ein Verlust an 9p21, das heißt keine Signale zu sehen sind. Die Durchführung des UroVysion™ am Urinsediment erweist sich in der Praxis als äußerst zeit- und personalintensiv und damit teuer. Insbesondere die Signalerfassung mit der Fluoreszenz-Mikroskopie erfordert einen gut ausgebildeten und äußerst routinierten Auswerter und bleibt dabei dennoch in beträchtlichem Maße subjektiv. Die eingangs beschriebenen krankheitsdefinierenden Kriterien (Signalhäufigkeiten) wurden darüber hinaus mehrfach in Frage gestellt beziehungsweise modifiziert (Pajor et al., 2011; Bubendorf et al., 2001; Friedrich et al., 2003; Varella-Garcia et al., 2004), was für den Anwender in der Praxis die Frage aufwirft, nach welchen Kriterien die Probe zu bewerten ist.

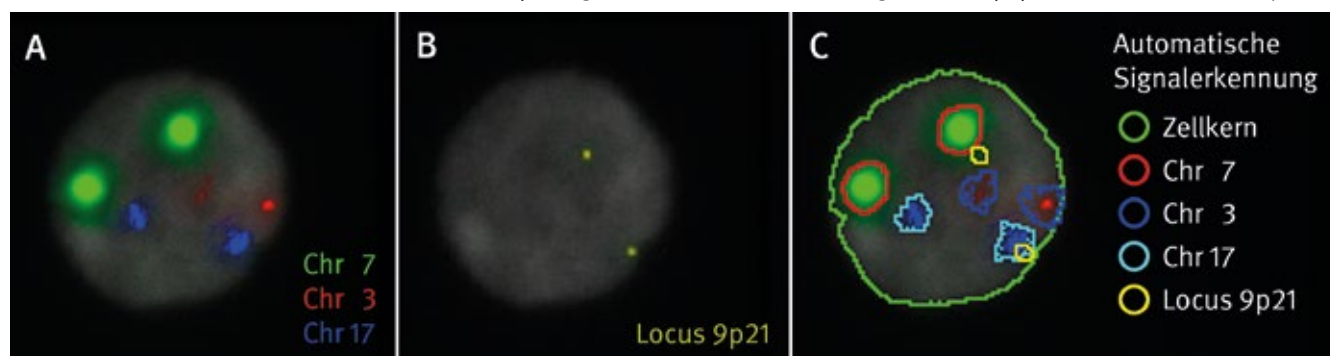
Automatisiertes Verfahren am IPA entwickelt

In Zusammenarbeit mit dem durch das Wissenschaftsministerium des Landes Nordrhein-Westfalen geförderten Drittmittelprojekt PURE (Protein Research Unit Ruhr within Europe, Sprecher Prof. Dr. K. Gerwert) wurde am IPA ein automatisiertes Computer-gestütz-

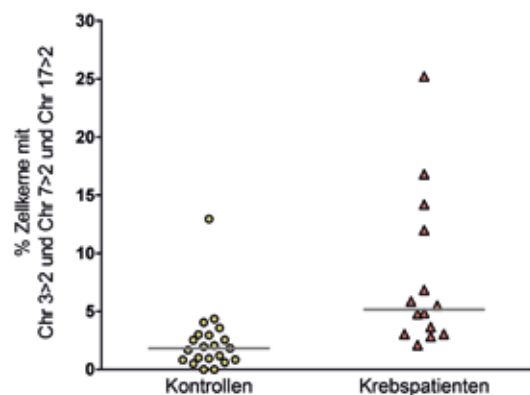
tes Verfahren für die FISH-Auswertung etabliert, welches objektive, reproduzierbare und archivierbare Ergebnisse generiert und darüber hinaus die quantitative Erfassung von Kernpopulationen verschiedener FISH-Muster erlaubt. Letztere wurde in Studien mit Urinproben von Krebskranken und Kontrollpersonen für die Suche nach diagnostisch sensitiven und spezifischen Auswertungskriterien für eine zuverlässige Unterscheidung von Tumorpatienten und gesunden Kontrollen angewendet. Das Fluoreszenz-Mikroskop konnte zunächst so programmiert werden, dass es die FISH-Proben vollautomatisch abfotografiert. Die standardisierte und automatisierte Belichtung vermindert Fehler bei der Signalzählung, die in der manuellen Version aufgrund der oftmals unterschiedlich langen und wiederholten Belichtungen und dem damit verbundenen inhomogenen Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe kaum vermieden werden können. Gleichzeitig limitiert das automatisierte Abfotografieren lange Arbeitsperioden im Dunkeln, entkoppelt die mikroskopische „Betrachtung“ von der Auswertung und ermöglicht damit ein flexibleres und weniger kostenintensives Zeit-Management im Labor. Die Bildauswertung konnte so automatisiert werden, dass sie die Zellkerne und die einzelnen FISH-Signale in der Probe automatisch erkennt und den einzelnen Chromosomen 3, 7 und 17 sowie dem Locus 9p21 zuordnet. Auf der Basis der erkannten Zellkerne und der zugeordneten FISH-Signale ermöglicht die verwendete Software die quantitative prozentuale Erfassung von numerischen Chromosomenaberrationen und deren Kombinationen im Zellkern.

Pilotstudie mit humanen Urinproben

In einer Pilotstudie mit Urinproben von gesunden Kontrollpersonen und Harnblasenkrebspatienten konnten insgesamt 54 verschiedene FISH-Muster zur zuverlässigen Unterscheidung von Tumor- und Kontrollpatienten getestet werden. Die Proben der Krebspatienten wurden im Rahmen einer Kooperation vom Marienhospital Herne, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum (Prof. Dr. J. Noldus) bereitgestellt. Die Proben der tumorfreien Kontrollpersonen stammen von der Heinz Nixdorf Recall Studie, einer populationsbasierten Kohorte (Schmermund et al., 2002), und wurden von der Universitätsklinik Essen (Prof. Dr. K.-H. Jöckel) bereitgestellt. Die beste Unterscheidung von Tumor- und Patientenproben wurde hierbei durch die Erfassung einer Kernpopulation erreicht, welche jeweils



Signalerkennung durch die automatisierte Analyse am Beispiel eines gesunden Zellkerns. Weil die Software nur 4 Farben anzeigen kann, werden zwei Bilder zur Darstellung aller Signale im selben Zellkern benötigt (A) Signale der Sonden gegen die Chromosomen 3, 7 und 17 (B) Signale der Sonde gegen den 9p21-Locus (C) Erkennung von Zellkern und FISH-Spots durch die automatisierte Analyse.



Häufigkeiten analysierter Zellkerne mit mehr als 2 Kopien der Chromosomen 3 und 7 und 17 bei Krebspatienten und Kontrollen. Der Anteil von Zellen mit diesem FISH-Muster ist bei Krebspatienten signifikant höher als bei Kontrollen. Der waagerechte Strich kennzeichnet den Median.

mehr als zwei Kopien der Chromosomen 3 und 7 und 17 enthielt. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Signale der 9p21-Sonde von geringerem diagnostischem Wert. Um die Voraussetzung für eine „Hochdurchsatz-Analyse“ zu schaffen, wurde im Laufe der Arbeiten eine Apparatur entwickelt, mit der bis zu acht Proben auf demselben Objektträger bearbeitet werden können, während beim konventionellen UroVysion™ lediglich eine einzige Probe pro Objektträger analysiert wird. Damit können beim Einsatz eines 4-er-Adapters für Objektträger in Abwesenheit eines Bedieners bis zu 24 Proben in einem Batch-Prozess gescannt werden. Die Pilotstudie mit humanen Urinproben bestätigte den Wert der Chromosomen 3, 7 und 17 für die Detektion von Blasenkrebs. Für die vielversprechendsten Kombinationen dieser Parameter werden derzeit verlässliche diagnostische Cut-Offs entwickelt.

Fazit für die Praxis

Die entwickelte automatisierte FISH-Analyse ermöglicht eine objektive und umfassende Zählung der Kopienzahl der Chromosomen 3, 7 und 17 in Zellkernen des Urinsediments sowie die komplexe Quantifizierung von Kern-Populationen definierter FISH-Muster zur Früherkennung von Harnblasenkrebs. Zeit und Kosten der Analyse werden dabei durch die Automatisierung gegenüber den herkömmlichen Protokollen erheblich reduziert. In Kombination mit der standardisierten automatischen und damit nachvollziehbar objektiven Auswertung ist das Testverfahren – im Gegensatz zur manuellen Auswertung – damit deutlich interessanter für die Praxis, unter anderem auch für dessen Anwendung im Bereich der arbeitsmedizinischen und betrieblichen Vor- und Nachsorge. Das Verfahren steht am IPA allen Unfallversicherungsträgern für die Früherkennung von Harnblasenkrebs bei Beschäftigten, die beruflich Umgang mit krebserzeugenden Gefahrstoffen haben, unter anderem aromatischen Aminen, zur Verfügung.

Die Autoren

Prof. Dr. Thomas Behrens,
Nadine Bonberg, Prof. Dr. Thomas Brüning,
Dr. Heiko U. Käfferlein, Dr. Christina U. Köhler, Laura Martin
IPA

Beitrag als PDF



Literatur

- Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, et al. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 79
- Friedrich MG, Toma MI, Hellstern A et al. Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer. *BJU Int* 2003; 92: 911
- Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 2000; 164: 1768
- Knowles MA. Bladder cancer subtypes defined by genomic alterations. *Scand J Urol Nephrol* 2008; 218 (Suppl): 116
- Pajor G, Somogyi L, Melegh B, et al. Urovysion: Considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set, statistically derived diagnostic criteria. *Cytometry A* 2011; 79: 375
- Schmermund A, Mohlenkamp S, Stang A, Gronemeyer D, Seibel R, et al. Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study. Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle. *Am Heart J* 2002; 144: 212-218
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10
- Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol* 2003; 169: 2101
- Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The Development of a Multitarget, Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Assay for the Detection of Urothelial Carcinoma in Urine. *J Mol Diagn* 2000; 2: 116
- Varela-García M, Akduman B, Sunpaweravong P, et al. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol* 2004; 22: 16