

Stand des Wissens zur molekularen Pathologie des Urothelkarzinoms

Im Kontext der Änderung der WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2004 wurde die Einteilung des Gradients in „Low-“ und „High-grade-Tumoren“ mit dem Begriff der genetischen Stabilität bzw. Instabilität namentlich und inhaltlich untermauert [7, 12]. Insbesondere war bis dahin durch molekulargenetische Daten aus dem Tumorgewebe deutlich geworden, dass die nichtinvasiven High-grade-Tumoren häufig p53- und p16-Mutationen aufweisen und oft als Zeichen der genetischen Instabilität auch eine Aneuploidie zeigen.

Für die flachen urothelialen Läsionen wurde gleichartig festgelegt, dass die genetisch instabile Zelle oder Zellgruppe auch ohne vollständige Schichtungsstörung des Urothels schon eine High-grade-Läsion ist. Damit wird der genetisch instabilen Zelle, die mikroskopisch als hyperchromatische unreifere Zelle erkennbar ist, eine wesentliche diagnostische Bedeutung gegeben, die die Therapieentscheidung des Urologen beeinflusst. Hingegen zeigen die nichtinvasiven Low-grade-Tumoren überwiegend Chromosom-9-Deletionen und -Mutationen.

Die WHO-Klassifikation wurde als Arbeitsklassifikation bezeichnet, und es gilt, den genetisch stabilen Tumor vom genetisch instabilen Tumor weiter abzugrenzen. Wesentliche neue Erkenntnisse kommen durch Daten zum Verteilungsmuster der *FGFR3*-Mutationen, durch transgene und „Knock-out-Modelle“ und den Versuchen, die Stammzellen zu identifizieren.

FGFR3

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (*FGFR3*) gehört in die Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren und liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4, Region 4p16.3. Interessanterweise wurden im Harnblasenkarzinom somatische, rezeptoraktivierende Mutationen häufig bei papillären Low-grade-Tumoren gefunden und waren anschließend ebenso in Hyperplasien des Urothels und gutartigen Papillomen nachweisbar [17]. Dieses Profil ist mit guter Prognose assoziiert und schließt das Vorliegen einer p53-Mutation fast aus. Gleichartige Mutationen wurden bezeichnenderweise auch in seborrhoischen Keratosen der Haut gefunden, einer Proliferation des Plattenepithels, welche nicht mit Malignität assoziiert ist. Auch wenn die Biologie dieser Beobachtung erst in Anfängen aufgeklärt ist [6], untermauert der Befund die Trennung zwischen Low- und High-grade-Tumoren [10].

Neue Erkenntnisse aus Mausversuchen

Zu den Beobachtungen der Verteilung von *FGFR3*-Mutationen gibt es eine Parallele aus transgenen Mausmodellen und Knock-out-Mausystemen. Wenn das *H-Ras*-Gen konstitutiv aktiviert wird, entsteht in der Mausharnblase eine Hyperplasie des Urothels, die in Abhängigkeit von der Stärke der Genaktivierung zu papillären Low-grade-Tumoren fortschreitet, die nicht progredient werden [18].

Bei einigen Mutationen des *FGFR3*-Gens kann es zur konstitutiven „Down-stream-Aktivierung“ von ras-GTPase kommen, dessen Resultat dem der *H-Ras*-Mutation identisch ist und sich im Mausversuch gegenseitig ausschließt (Abb. 1 a).

Wichtig für das Verständnis der Tumorentstehung allgemein ist, dass das normale Urothel durch die Proteine der Retinoblastomgenfamilie besonders geschützt ist. Hierbei handelt es sich sowohl um das pRB-Protein selbst als auch um p107 und p130. Diese Proteine werden über die gesamte Höhe des Urothels exprimiert und sind eine Erklärung dafür, dass das normale Urothel eine niedrige „Turnover-Rate“ von 200 Tagen hat. Dabei ist es auch faszinierend, dass die normale Deckzelle nicht nur vor toxischen Substanzen im Urin schützt, sondern auch verhindert, dass die im Urin relativ hoch konzentrierten Wachstumsfaktoren der Tyrosinkinasefamilie (insbesondere der epidermale Wachstumsfaktor/EGF) an die Basalzellen herankommen, die die einzige Zellpopulation mit dem EGF-Rezeptor im Urothel ist [14].

Kommen wir zurück zum Schutz durch die Retinoblastomgen-Proteine, dann wird verständlich, dass sowohl eine alleinige p53-Mutation als auch eine p53- und pRB-Mutation nicht mit invasivem Wachstum im Mausmodell einhergehen. Weil die pRB-Knock-out-Maus letal ist und die p53-Knock-out-Maus früh (nichturotheliale) Tumoren zeigte, konnte man erst durch die Weiterentwicklung in der Mausforschung mit konditionellen

Knock-out-Systemen rezent der häufigen Beobachtung, dass viele invasive Tumoren beide Mutationen zeigen, auch funktionell nachgehen. Dabei zeigte sich, dass die Mutation beider Gene für invasives Wachstum nicht ausreicht. Es zeigte sich insbesondere auch, dass bei der Mutation beider Gene p107 hochreguliert wird und eine kompensatorische Schutzfunktion annimmt. Die zusätzliche Ausschaltung von p107 durch Gabe des Urothelkarzinogens BBN an p53/pRB-Null-Mäuse ergab invasive Tumoren (■ **Abb. 1 b**).

Die geschilderten Befunde deuten das Potenzial der modernen Mausforschung an und werden in enger Wechselwirkung mit Daten von menschlichen Gewebeproben weitere Möglichkeiten z. B. für das Verständnis von PTEN-Ausfällen im Urothel oder invasive Tumoren ohne p53- und pRB-Verlust hervorbringen.

Die Tumorstammzelle des Urothels

Tumorstammzellen sind weitgehend undifferenzierte Zellen, die unbegrenzt proliferieren können und die genoprotektive Mechanismen besitzen, die ähnlich oder identisch denen von normalen, adulten epithelialen Stammzellen sind. Die Tumorstammzellen sind die Grundlage für Tumorerheterogenität und auch von Therapieresistenz. Diese Einsichten stammen mehrheitlich von Arbeiten über und mit hämatopoetischen Stammzellen [11], aber empirische Erkenntnisse über die urothelialen Stammzellen und nun auch zunehmend solche über urotheliale Tumorstammzellen kommen hinzu [2]. Zellen, die die oben genannten Kriterien erfüllen, sind insbesondere Zellen, die einen Basalzellphänotyp besitzen, da diese Zellen in experimentellen Systemen die höchste Klonogenität zeigen [9]. Dieses gilt z. B. für eine Zelle, die CK20- und CD44-negativ, aber CK5/6-positiv ist im Kontrast zu dem differenzierten Gegenstück, einer CK20- und CD44-positiven Zelle, die CK5/6-negativ ist.

Die oben beschriebenen Kontraste eines papillären Low-grade-Tumors und eines flachen High-grade-Tumors legen unterschiedliche Differenzierungsprogramme dieser Tumortypen nahe. Eine Arbeitshypothese von Brand und Mitar-

Pathologie 2010 · [Suppl 2] 31:234–238 DOI 10.1007/s00292-010-1324-z
© Springer-Verlag 2010

R. Knüchel-Clarke · E. Dahl · N.T. Gaisa · K. Schwamborn · K. Lindemann-Docter · C. Henkel Stand des Wissens zur molekularen Pathologie des Urothelkarzinoms

Zusammenfassung

Ergebnisse der molekularen Pathologie haben die Änderung der WHO-Klassifikation des Urothelkarzinoms 2004 unterstützt. Seither erbrachten neue molekulare Daten wie das Verteilungsmuster des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 3 (FGFR3) eine weitere Untermauerung des Prinzips einer „Low-“ und „High-grade-Entität“ des Urothelkarzinoms. Aus Tierversuchen mit „Knock-out-Mäusen“ und konditionellen Genaus-schaltungen werden wesentliche Parallelen zu der Situation im Menschen deutlich und der zelluläre Kontext als Auslöser der Entartung betont. Dabei besteht eine Besonderheit des Urothels in einem hohen Schutz der Urothelzelle durch mehrere Mitglieder der Retinoblastomgenfamilie, die eine Invasion, z. B. nach p53-Mutation, effektiv verhindert.

Auf der Suche nach der Tumorstammzelle rückt derzeit der Basalzellphänotyp in den Vordergrund, der ein hohes klonogenes Potenzial hat. Gleichzeitig hilft die aufwendige Analyse der Verteilung mitochondrialer Mutationen innerhalb des Urothels, mehr über die Ausbreitung eines Normal- oder Tumorzellklons zu lernen.

Die derzeitige Datenlage macht deutlich, dass für entscheidende diagnostische und prognosebestimmende Aussagen für das Urothelkarzinom nur mehrparametrische Methoden zielführend sein können.

Schlüsselwörter

Urothel · Molekulare Entstehung · Tumorstammzelle · Klonalität · Mehrparametrisch

Current knowledge in molecular pathology of urothelial cancer

Abstract

Results of molecular pathology have supported changes in the 2004 WHO classification of urothelial cancer. Since then new molecular data such as the distribution pattern of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) has further supported the principle of low and high grade entities of urothelial carcinoma. Animal experiments with knockout mice and conditional knockout systems reveal important parallels to humans and results emphasize the cellular context as a trigger for malignancy. One special feature of the urothelium is its high protection of the urothelial cells by members of the retinoblastoma gene family, efficiently inhibiting invasion even in the presence of p53 mutations. In search of

the tumor stem cell phenotype the basal cell phenotype is the focus of attention providing a high clonogenic potential. At the same time detailed analysis of the distribution of mutations in the mitochondrial genome within the urothelium will help to gain insight into the spreading of normal cell or tumor cell clones.

The overall data in urological oncology provide evidence that diagnostic and prognostic tools for urothelial cancer can only be reached with multiparametric approaches.

Keywords

Urothelium · Molecular origin · Tumor stem cell · Clonality · Multiparametric

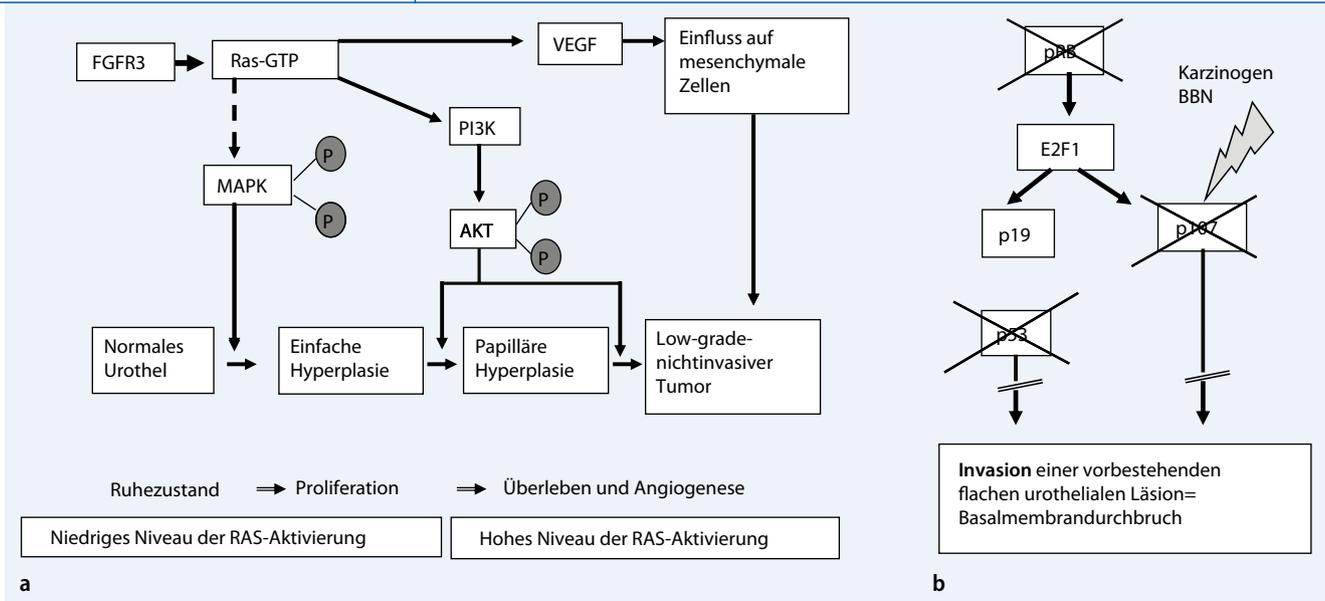


Abb. 1 ▲ Wesentliche Eckdaten zur Genese nichtinvasiver papillärer und invasiver Urothelkarzinome aus transgenen Mausversuchen (adaptiert nach [18]). **a** Dosisabhängigkeit der Aktivierung der ras-Signalweg-Effektoren mit dem Endresultat eines nichtinvasiven Low-grade-Tumors. Während ein niedriges Niveau des aktivierten Ha-ras (Ras-GTP-Aktivierung) über den MAP-Kinase Signalweg zur Urothelhyperplasie führt, bewirkt eine Verdopplung der transgenen Ha-ras-Dosis u. a. über den AKT-Signalweg eine Bildung papillärer Tumoren, die „low grade“ sind. Von *FGFR3* weiß man, dass einige Mutationen zur konstitutiven GTP-ras-Aktivierung führen und damit denselben Signalweg starten. **b** Gemeinsame Effekte der Proteine der pRB-Familie und p53 bei der Invasion von urothelialen Tumoren. Während eine p53-Mutation zusammen mit einer RB-Mutation im Mausversuch nicht ausreichen, wird mit der zusätzlichen Inaktivierung von p107 (Gen/Protein aus der Retinoblastomfamilie in p53/Rb-Nullmäusen) invasives Wachstum induziert

beitern [2] besteht darin, dass der papilläre Tumor von einer transient amplifizierenden Intermediärzelle ausgeht, deren Teilungspotenzial als Tumorzelle begrenzt ist. Im Gegensatz dazu könnte der invasive Tumor von einer Basalzelle ausgehen und unterstützt durch den direkten Kontakt zum Stroma (Bindegewebs- und Entzündungszellen) invasiv werden.

Aus welcher Stammzelle die Tumortypen entstehen, ist bisher nicht klar, sollte aber zusätzlich zu den Untersuchungen im normalen Urothel durch stammzellorientierte Phänotypisierung von Tumoren ergänzt werden. Da man davon ausgeht, dass für das Tumorstadium noch unzureichende Mutationen vorab in einer Urothelzelle akkumulieren müssen, bevor tumorigene Mutationen das Wachstum stärker beeinflussen, darf man annehmen, dass diese Mutationen in den lange vorliegenden Stammzellen am besten akkumulieren können und hier einen Feldeffekt bedingen. Derartige Felder sind zum Lernen über Klonalität besonders gut durch den Nachweis zellkernunabhängiger Mutationen erforschbar. Hierbei verwendet man Mutationen im Genom der Mitochondrien, deren Effekt sich histoche-

misch darstellen lässt und uns in Analogie zu Untersuchungen im Gastrointestinaltrakt die Expansion von klonalen Populationen im Urothel verstehen helfen wird [13]. Durch das weitere Erforschen der Tumorstammzelle des Urothels und die Ausbreitung und Differenzierung der daraus hervorgehenden Zellen werden wir neue Ansätze zum Verständnis von Chemotherapieresistenz und Tumorrezidiventstehen erhalten.

Mehrparametrische Ansätze für die Diagnose und Prognosebestimmung

Eine kritische Sicht der Datenlage macht deutlich, dass eine differenzierte individuelle Diagnosestellung und Therapieentscheidung sehr unwahrscheinlich mit einem Marker erfolgt, wie er in vielfacher Form für Urinuntersuchungen propagiert worden ist.

Derzeitige vielversprechende Ansätze für die Urinanalytik sind sowohl Expressions-Arrays als auch epigenetische Untersuchungen und MikroRNA-Panels (z. B. [15]). Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung des Proteinprofils von Tumoren

mittels proteomischer Techniken (zweidimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie) von Gewebe oder Körperflüssigkeiten. Aufgrund seiner im Vergleich zum Genom deutlich höheren Komplexität und Flexibilität kann das Proteom, das Proteinäquivalent des Genoms, als sensitive Sonde für Veränderungen im Gesundheitszustand der Zelle verwendet werden [4, 8]. Beim Menschen stehen einer Anzahl von etwa 40.000 Genen geschätzt mehr als 500.000 Proteine gegenüber [1].

Eine vergleichsweise neue Technik, die direkt in die Gewebediagnostik zurückführt, ist das so genannte „MALDI- („matrix-assisted laser desorption ionization“) Imaging“, das eine direkte Korrelation von histomorphologischen Details mit den Proteinmustern im Gewebe erlaubt [3, 5] und rezent auch Untersuchungen am Paraffinmaterial erlaubt. Parallelen zu den im Urin und Blut erhobenen Befunden können auf dem Boden valider biostatistischer Daten Subklassen des Urothelkarzinoms identifizieren helfen ([16] und **Abb. 2 a–d**).

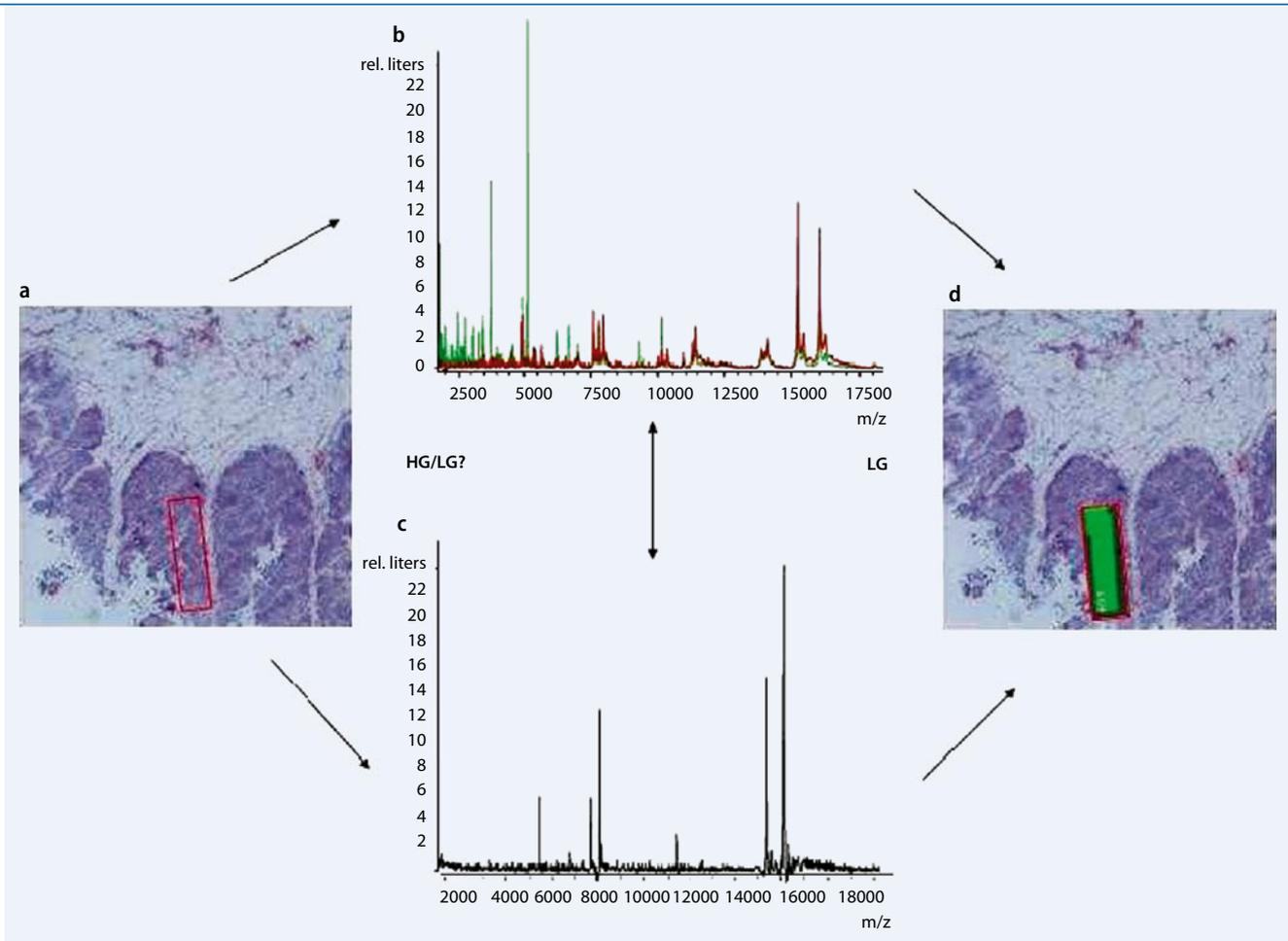


Abb. 2 ▲ Beispiel aus einem MALDI-Imaging-Experiment von Low-grade- im Vergleich zu High-grade-Urothelkarzinomen. Eine automatische Klassifikation von pTaG1, G2 und G3 Tumoren in die 2 Klassen: Low- (LG) und High-grade (HG) wurde durchgeführt. **a** Histologischer Gefrierschnitt (HE-Färbung, Übersicht) mit markierter „region of interest“ (ROI). **b** Summenspektrum im Massenspektrum von 2000–16.000 Dalton, das von zahlreichen pTa-Low-grade- (grün) und pTa-High-grade- (rot) Tumoren erhoben worden ist. Differenziell exprimierte Proteine aus diesen Spektren werden in einem „Support-vector-based-Modell“ als Rechenalgorithmus verwendet, um die Unterscheidung zwischen Low- und High-grade zu definieren. **c** MALDI-Imaging-Einzelspektrum der in **a** eingezeichneten unklaren ROI, 120 Spektren wurden in dieser Region vermessen und automatisch klassifiziert. **d** HE-Schnitt mit der automatischen farbkodierten Klassifikation der ROI in grün, d. h. als Low-grade-Tumor (rel.liters relative Intensität, m/z Masse/Ladung)

Fazit für die Praxis

Trotz der morphologisch strukturellen Einfachheit des Urothels ist die Sicherheit der nichtinvasiven Diagnostik und z. T. auch der Histopathologie noch eingeschränkt und bedingt einerseits zu viele invasive diagnostische Eingriffe, andererseits therapeutische Massnahmen mit unzureichenden Therapieerfolgen. Für die alltägliche Praxis ist es hilfreich, die bestehende 2004-WHO-Klassifikation von urothelialen Tumoren konsequent anzuwenden, da wesentliche Teile dieser Klassifikation durch aktuelle molekulare Daten untermauert werden.

Für wesentliche Fortschritte, die translational umgesetzt werden können, bedarf es einer Kombination funktioneller, zellbiologischer und tierexperimenteller Forschung mit Datenbank-getriebenen Metaanalysen und „Pathway-profiling-Strategien“ an humanem Material, die dann in sinnvollen mehrparametrischen Assays mit umschriebener Fragestellung getestet werden sollten. Die Robustheit und Kosteneffektivität von Tests sind weitere wichtige Teilaspekte einer langfristigen klinischen Implementierung mit dem Ziel einer individuelleren Patientenführung.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke
 Institut für Pathologie,
 Medizinische Fakultät der RWTH Aachen
 Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
 rknuechel-clarke@ukaachen.de

Danksagung. Die hier geschilderten Arbeiten wurden z. T. mit Forschungsgeldern der DFG gefördert (N.T. Gaisa) sowie aus Fakultätsmitteln der Medizinischen Fakultät RWTH Aachen (START, C. Henkel).

Interessenkonflikt. Die korrespondierende Autorin gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF et al (2000) Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 356:1749–1756
2. Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, He X et al (2009) Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev* 28:291–304
3. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF-MS. *Anal Chem* 69:4751–4760
4. Celis JE, Gromov P (2003) Proteomics in translational cancer research: towards an integrated approach. *Cancer Cell* 3:9–15
5. Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM (2004) Proteomics in diagnostic pathology. Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J Pathol* 165:1057–1068
6. DiMartino E, L'Hote CG, Kennedy W et al (2010) Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signalling and cellular transformation in a cell type- and mutation specific manner. *Oncogene* 28:4306–4316
7. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (eds) (2004) Tumors of the urinary system and male genital tract. WHO Classification of Tumours. Pathology & Genetics. IARC, Lyon
8. Hanash S (2003) Disease proteomics. *Nature* 422:226–232
9. He X, Marchionni L, Hansel DE et al (2009) Differentiation of highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells* 27:1487–1495
10. Knowles MA (2006) Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? Review. *Carcinogenesis* 27:361–373
11. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J et al (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645–648
12. Lindemann-Docter K, Knüchel R (2008) Update on urothelial carcinoma histopathology. *Pathologie* 29:331–338
13. McDonald SA, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L et al (2008) Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology* 134:500–510
14. Messing EM (1992) Growth factors and bladder cancer. Clinical implications of the interaction between growth factors and their urothelial receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 50:2530–2537
15. Ostenfeld MS, Bramsen JB, Lamy P et al (2010) miR-145 induces caspase-dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene* 29:1073–1084
16. Schwamborn C, Krieg RC, Grosse J et al (2009) Serum proteomic profiling in patients with bladder cancer. *Eur Urol* 56:989–987
17. Stoehr R, Hartmann A (2007) Histopathologie und Molekulargenetik des Harnblasenkarzinoms. Review. *Oncogene* 12:1058–1066
18. Wu X-R (2009) Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. *Cancer Metastasis Rev* 28:281–290