

Evaluation der multicolor Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Diagnostik von Harnblasentumoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Tobias Fritsch
geboren am 10. Februar 1975 in Jena

Gutachter:

1. PD Dr. med. Kerstin Junker, Jena
2. Prof. Dr. med. Iver Petersen, Jena
3. Prof. Dr. med. Arndt Hartmann, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. September 2009

Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|-------------|---|
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin |
| CCD-Sensor | Charge Coupled Device, (sinngemäße Übersetzung: „ladungsgekoppeltes Bauteil“, hier spezieller Bildsensor) |
| CEP | Chromosom Enumerations Probe |
| Cis | Carcinoma in situ |
| DBC1 | Deleted in bladder cancer 1 (Gen auf Chromosom 9) |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| EAU | European Association of Urology |
| EORTC | European Organisation for Research and Treatment of Cancer |
| FGFR3 | Fibroblast growth factor receptor 3 |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| LOH | Loss of heterozygosity (Verlust der Herterozygotie) |
| LSI | Locus spezifische Identifikationssonde |
| MAP-Kinase | mitogen-activated protein-Kinase |
| MDM2 | murine double minute Onkogen |
| mFISH | multicolor Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| mTOR | mammalian Target of Rapamycin |
| MYC-Gen | myelocytomatosis viral oncogene |
| PDD | photodynamische Diagnostik |
| PI3-Kinase | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PTCH | patched homolog 1 (Drosophila) |
| PUNLMP | papillary urothelial neoplasm with low malignant potential |
| Ras | Rat sarcoma (Proto-Onkogen) |
| SD | Standard deviation (Standardabweichung) |
| SIRT1 | silent mating type information regulation 2 homolog |
| TSC1 | tuberous sclerosis complex |
| TUR-B | transurethrale Resektion (in der) Harnblase |
| UICC | Union internationale contre le cancer |
| UKJ | Universitätsklinikum Jena |
| v. l. n. r. | von links nach rechts |
| WHO | World Health Organization |

Inhaltsverzeichnis:

| | Seite |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 4 |
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1. Das Harnblasenkarzinom | 6 |
| 1.1.1. Epidemiologie | 7 |
| 1.1.2. Ätiologie | 7 |
| 1.1.3. Histologische Klassifikation und TNM Klassifikation | 9 |
| 1.1.3.1. Typisierung der Harnblasentumoren | 9 |
| 1.1.3.2. Grading der Harnblasentumoren | 11 |
| 1.1.3.3. Die TNM-Klassifikation der Harnblasentumoren | 11 |
| 1.1.4. Diagnostik | 12 |
| 1.1.5. Therapie | 15 |
| 1.1.6. Prognose | 19 |
| 1.1.7. Genetische Veränderungen | 20 |
| 2. Fragestellung und Ziele | 29 |
| 3. Material und Methoden | 30 |
| 3.1. Patientenkollektiv | 30 |
| 3.2. Material (Urin / Tumorgewebe) | 31 |
| 3.3. Methoden | 31 |
| 3.3.1. Urinzytologie | 31 |
| 3.3.2. Präparation der Zellkerne | 32 |
| 3.3.3. mFISH | 33 |
| 3.3.4. Fluoreszenzmikroskopie | 36 |
| 3.3.6. Datenerfassung und Auswertung | 39 |
| 4. Ergebnisse | 40 |
| 4.1. mFISH-Untersuchung des Urins (gesamtes Kollektiv) | 40 |
| 4.2. Urinzytologie (gesamtes Kollektiv) | 42 |
| 4.3. Gegenüberstellung Urinzytologie – mFISH-Untersuchung des Urins | 44 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.4. | Kombination beider Methoden (Zytologie und mFISH) | 46 |
| 4.5. | mFISH-Untersuchung des Urins (Untergruppe Urin / Tumormaterial) | 47 |
| 4.6. | mFISH-Untersuchung des Tumormaterials (Untergruppe Urin / Tumormaterial) | 48 |
| 4.7. | mFISH des Tumormaterials im Vergleich zur mFISH des Urins und zur Zytologie | 49 |
| 4.8. | Verlauf der Fälle mit positivem mFISH-Urinbefund ohne histologischen Tumornachweis | 51 |
| 5. | Diskussion | 52 |
| 5.1. | Einordnung der Ergebnisse der mFISH-Untersuchung und der Urinzytologie | 52 |
| 5.2. | Vergleich der mFISH-Urinuntersuchung mit den Ergebnissen der Urinzytologie | 55 |
| 5.3. | Kombinierter Einsatz der mFISH-Urinuntersuchung und der Urinzytologie | 57 |
| 5.4. | Untersuchungen am Tumormaterial | 58 |
| 5.5. | Verschiedene Konstellationen bei der Untersuchung des Tumormaterials | 61 |
| 5.6. | Prognose bei positivem mFISH-Befund | 64 |
| 6. | Schlussfolgerungen | 66 |
| 7. | Ausblick | 68 |
| | Tabellen | 70 |
| | Tabellenverzeichnis | 78 |
| | Abbildungsverzeichnis | 80 |
| | Literatur- und Quellenverzeichnis | 81 |
| | Anhang | 93 |

Zusammenfassung

Patienten mit rezidivierenden Urothelkarzinomen der Harnblase beherrschen den klinischen Alltag des Urologen. Im Vordergrund steht die frühzeitige Diagnostik von Primär- und Rezidivbefunden mit dem Ziel, eine organerhaltende Therapie zu ermöglichen. Sowohl für die Primärdiagnostik als auch für die Tumornachsorge stellt die Zystoskopie als invasive Methode den „Goldstandard“ dar.

Eine Vielzahl neuer nichtinvasiver urinegebundener Untersuchungsmethoden ist neben dem etablierten Verfahren der Urinzytologie verfügbar. Diese versprechen neben einem besseren Patientenkomfort eine höhere Sensitivität im Vergleich zur Zytologie. Eine genaue Einordnung in die Methoden der Standarddiagnostik ist aufgrund der bisher unzureichenden Datenlage jedoch nicht möglich.

Das Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (mFISH) wurde auf der Grundlage bekannter genetischer Veränderungen von Urothelkarzinomzellen zu einem relativ einfach anwendbaren Testkit weiterentwickelt. Laut Angaben in der Literatur ermöglicht diese Methode die Diagnostik von Urothelkarzinomen mit einer höheren Sensitivität als die Urinzytologie bei einer vergleichbaren Spezifität. Unsicherheiten bestehen jedoch aufgrund einer erheblichen Schwankungsbreite der publizierten Ergebnisse und der geringen Sensitivität bei der Diagnostik von nicht muskelinvasiven gut differenzierten Tumoren.

Die vorliegende Arbeit soll den diagnostischen Stellenwert einer mFISH-Untersuchung von Zellen im Urin bei Patienten mit zystoskopisch tumorverdächtigen Harnblasenbefunden darstellen. Hierzu erfolgte die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der mFISH anhand der Untersuchung von Urinproben aus dem eigenen Patientengut im Vergleich zu den Ergebnissen der parallel angefertigten Urinzytologie und des kombinierten Einsatzes beider Methoden. Zusätzlich wurden diese Parameter für die mFISH des parallel aufgearbeiteten Tumormaterials bestimmt. Zur Illustration des prognostischen Stellenwertes der mFISH wurde eine retrospektive Analyse des klinischen Verlaufs bei Patienten mit auffälligen mFISH-Befunden ohne histologischen Tumornachweis durchgeführt.

Anhand der Urinuntersuchungen (144 Fälle) konnte für die mFISH eine Sensitivität von 49,5 % bei einer Spezifität von 81,5 % festgestellt werden. Differenziert nach Infiltrationstiefe und Grading ließ sich für pTa-, pT1- und für muskelinvasive Tumoren (\geq pT2a) eine Sensitivität von 35,9, 62,5 und 100 %, für die G1-, G2- und G3-

Tumoren 35,6, 60,7 und 91,7 % ermitteln. Die zum Vergleich parallel angefertigte Urinzytologie konnte eine Sensitivität von 41,5 % (pTa: 35,6, pT1: 45,8, pT2a: 87,5, G1: 30,3, G2: 60 und G3: 60 %) bei einer Spezifität von 79,3 % erreichen.

Durch die Kombination der Ergebnisse beider Methoden (Zytologie und/oder mFISH-Untersuchung positiv) ließ sich die Sensitivität auf 57,5 % (pTa: 46,2, pT1: 75, ≥ pT2a: 100, G1: 41,4, G2: 80,7 und G3: 91,7 %) erhöhen. Die Spezifität betrug hierbei 74,2 %.

Eine höhere Sensitivität von 74 % ergab sich für die 73 Fälle der parallel durchgeführten mFISH der Tumorgewebeproben (pTa: 70,6, pT1: 76,9, pT2a: 85,7, pT3a: 100, pT3b: 100, G1: 68,8, G2: 75 und G3: 100 %).

Im Rahmen der retrospektiven Auswertung der Fälle mit positivem mFISH-Urinbefund ohne histologischen Tumornachweis ließ sich bei 5 von 7 Patienten ein Tumornachweis nach im Median 15 Monaten ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mFISH im Vergleich zur Urinzytologie eine höhere Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität aufweist. Insbesondere bei schlecht differenzierten Tumoren und muskelinvasiven Befunden ist hiermit eine sichere Aussage möglich. Durch die Kombination der Urinzytologie mit der mFISH kann eine weitere Verbesserung der Sensitivität erreicht werden.

Anhand des Vergleiches mit den Tumorgewebeproben ließen sich Ansatzpunkte für eine Verbesserung des Tests erkennen. So besteht die Möglichkeit durch weitere Sonden, welche frühe genetische Veränderungen der Urothelkarzinome erfassen, die Sensitivität dieses Tests zu erhöhen. Einschränkend ist jedoch zu konstatieren, dass bei einem Teil der Tumoren die im Urin vorhandene Anzahl der detektierbaren Tumorzellen für dieses Verfahren nicht ausreichend war. Hier sind die Möglichkeiten zur Verbesserung eingeschränkt.

Zusätzlich ergaben sich Hinweise, dass ein positiver mFISH-Befund einem klinisch fassbaren Tumor vorausgehen kann, so dass in solchen Fällen eine weitere Abklärung oder eine engmaschigere Kontrolle erfolgen sollte.

Die mFISH wird die invasive Diagnostik beim Urothelkarzinom nicht ersetzen können. Sie bietet jedoch die Möglichkeit, die nicht invasiven Diagnostikverfahren um eine, insbesondere für die prognostisch ungünstigen Tumoren sehr sensitive Methode zu ergänzen.

1. Einleitung

1.1. Das Harnblasenkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist ein häufiger Tumor des Urogenitaltraktes. Es macht etwa 3 % aller malignen Erkrankungen aus.

Im klinischen Alltag stehen die frühzeitige Diagnose und die damit mögliche blasenerhaltende Therapie im Vordergrund. 70-80 % der Tumoren sind bei Diagnosestellung oberflächliche, nicht muskelinvasive Befunde und können durch lokale operative Verfahren prinzipiell kurativ behandelt werden. Kompliziert wird die Problematik durch eine hohe Rezidivneigung der Tumorbefunde. Dies macht eine engmaschige Nachsorge der Patienten notwendig, da ein möglicher Wandel zu einem invasiven Tumorgeschehen eine grundlegende Änderung der Therapiestrategie nach sich zieht.

Bei muskelinvasiven Tumorbefunden ist in der Regel ein radikaler tumorchirurgischer Eingriff, die Zystektomie mit entsprechender Harnableitung, notwendig. Als Folge ergibt sich eine nicht unerhebliche Morbidität mit entsprechender Einschränkung der Lebensqualität. Im Falle eines metastasierten Tumorleidens verschlechtert sich die Prognose trotz moderner Konzepte der Polychemotherapie erheblich.

Notwendig sind deshalb Verfahren zur Optimierung der Primärdiagnostik und der Tumornachsorge bei Patienten mit Harnblasentumoren.

Neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen bei der Entstehung von Malignomen im Allgemeinen, sowie über spezielle Aspekte bei der Entstehung von Urothelkarzinomen führten zur Entwicklung einer Vielzahl nichtinvasiver Diagnostikverfahren. Als vielversprechenden Ansatz stellte sich die Identifizierung tumortypischer chromosomaler Veränderungen bei Urotheltumorzellen heraus, welche im Urin nachweisbar sind. Auf dieser Grundlage wurde ein Diagnostikverfahren zur Detektion chromosomaler Aberrationen auf der Basis einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) entwickelt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die FISH hinsichtlich ihrer Stellung in der Diagnostik und Nachsorge im Vergleich zu den etablierten Verfahren bei Patienten mit Harnblasentumoren zu evaluieren.

1.1.1. Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigen malignen Tumorerkrankungen des Menschen. In Deutschland wird es an vierter Stelle beim Mann und an achter Stelle bei der Frau eingeordnet. Es ist der häufigste Tumor des Harntraktes. Nach dem Prostatakarzinom beim Mann folgt es an zweiter Stelle der Tumoren des Urogenitalsystems.

In Deutschland sind im Jahr mehr als 25 000 Neuerkrankungen zu verzeichnen, wobei Männer drei- bis viermal so häufig wie Frauen betroffen sind. Die Inzidenz betrug im Jahre 2002 in Deutschland für Männer 46,8 / 100 000 Einwohner, für Frauen 16,9 / 100 000 Einwohner. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 70 und bei Frauen bei 73 Jahren (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut 2006).

Die Prognose variiert stark in Abhängigkeit vom Ausbreitungsstadium bei Diagnosestellung und Therapieeinleitung. Über alle Stadien betrug 2002 die Mortalitätsrate in Deutschland 8,5 bei Männern und 4,8 pro 100 000 Einwohner bei Frauen. Damit steht das Harnblasenkarzinom an zehnter bzw. elfter Stelle der Krebssterbefälle in Deutschland (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut 2006).

Mehr als 90 % der malignen Harnbasentumoren in der westlichen Welt gehen vom Urothel aus (Oosterlinck et al. 2002). Seltener sind Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und undifferenzierte Karzinome. Im Gegensatz dazu werden in den Endemiegebieten der Bilharziose bis zu 80 % Plattenepithelkarzinome beobachtet.

1.1.2. Ätiologie

Als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms wird heute das Zigarettenrauchen angesehen. Raucher haben ein 2- bis 3-fach erhöhtes Risiko, Blasenkrebs zu entwickeln. Es wird vermutet, dass 48 % dieser Erkrankungen dadurch ausgelöst werden. Nach Aufgabe des Rauchens reduziert sich zwar das Risiko um 30 % nach 1 bis 4 Jahren und um 60 % nach 25 Jahren. Ehemalige Raucher haben jedoch lebenslang ein höheres Risiko als die Normalbevölkerung (Marcus et al. 2000, Brennan et al. 2000).

Des Weiteren geht die Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien (zum Beispiel aromatische Amine, aromatische Kohlenwasserstoffe und Azofarbstoffe) mit einem erhöhten Risiko für Harnblasenkarzinome einher. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde durch Rehn (1895) ein Zusammenhang zwischen dem Umgang mit Anilinfarbstoffen in der Textilindustrie und dem Auftreten von Harnblasentumoren vermutet. Später konnten als eigentliche karzinogene Substanzen zahlreiche aromatische Amine (zum Beispiel: Benzidin, 4-Aminobiphenyl, o-Toluidin) identifiziert werden.

Als wichtigste Risikogruppen galten und gelten Arbeiter in der chemischen Industrie bei Umgang mit den entsprechenden Substanzen. Im Einzelnen kann für die Berufszweige in der Farbstoff-, Plastik- und Gummiindustrie durch aromatische Amine und Peroxyde, in der Textil- und Lederverarbeitung durch Azofarbstoffe und in der Mineralöl- und Aluminiumindustrie durch aromatische Kohlenwasserstoffe eine solche Belastung gegeben sein. Maler (durch Azofarbstoffe), Bergarbeiter (durch polyzyklische aromatische Amine und Arsen) und Kraftfahrzeugmechaniker (durch Nitroaromate im Dieseltreibstoff) haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Blasenkarzinome (Brownson et al. 1987, Thériault et al. 1984, Yamaguchi et al. 1991).

Die berufsbedingte Belastung mit diesen Noxen ist durch die Entfernung der bekannten Substanzen aus den Arbeitsprozessen bzw. durch entsprechende Arbeitsschutzmaßnahmen in Europa weitestgehend minimiert. Hingegen ist in manchen Ländern der 3. Welt und des ehemaligen Ostblocks von deutlich geringeren Standards im Arbeitsschutz auszugehen.

Aufgrund der langen Latenzzeit zwischen Exposition und Tumorentstehung auf der einen Seite und der anhaltenden Zuwanderung auf der anderen Seite ist jedoch mit dem Auftreten berufsbedingter Harnblasenkarzinome in Europa weiterhin zu rechnen (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut 2006, Kälble 2005).

Chronische bakterielle Entzündungen der Harnblase, wie sie bei Versorgung mit einem Dauerkatheter auftreten, aber auch rezidivierende Infekte bei Selbstkatheterismus (z.B.: bei Querschnittlähmung) gehen mit einem erhöhten Risiko der malignen Entartung einher.

Die Infektion mit *Schistosoma haematobium* (Bilharziose), zusätzlich begünstigt durch eine bakterielle Superinfektion mit Bildung von Nitrosaminen, führt ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme des Risikos für Blasen Tumoren. In den Endemiegebieten der Bilharziose finden sich hauptsächlich Plattenepithelkarzinome der Harnblase bei verhältnismäßig jungen Patienten (Tricker et al. 1989, Groeneveld et al. 1996, Thomas et al. 1990).

Der Stellenwert viraler Onkogene ist bislang ungeklärt. Möglicherweise sind bestimmte Typen humaner Papillomaviren (HPV) an der Induktion von Blasen Tumoren beteiligt.

Iatrogene Risikofaktoren, wie die Bestrahlung der Beckenregion und die systemische Applikation alkylierender Zytostatika (z.B.: Cyclophosphamid), müssen wie die Einnahme großer Mengen des Analgetikums Phenacetin ebenfalls genannt werden (Pashos et al. 2002).

Trotz einer Vielzahl gesicherter Risikofaktoren bleibt die Ätiologie im Einzelfalle häufig unklar.

1.1.3. Histologische Klassifikation und TNM Klassifikation

1.1.3.1. Typisierung der Harnblasentumoren

Mehr als 95 % der primären Harnblasentumoren sind epithelialen Ursprungs. Davon sind 80 % urothelialen, bis 10 % plattenepithelialen und ca. 2 % drüsigen Phänotyps. Weniger als 1 % sind undifferenzierte Karzinome (Eble et al. 2004). In Tabelle 1 wird die histologische Klassifikation der Harnblasentumoren in Anlehnung an die WHO-Typisierung dargestellt.

Im Bereich der Harnblase können auch sekundäre Malignome auftreten. Dabei handelt es sich um infiltrierende Tumoren der Nachbarorgane (Prostata, Dickdarm, weiblicher Genitaltrakt) oder um Fernmetastasen anderer Malignome.

Die Harnblasentumoren stellen zwar hinsichtlich ihrer Typisierung eine heterogene Gruppe dar, im klinischen Alltag überwiegen jedoch die Urothelkarzinome. Diese Arbeit wird sich aufgrund der klinischen Relevanz auf diese beschränken.

Tabelle 1: WHO Typisierung der Tumoren der Harnblase (modifiziert nach Eble et al. 2004)

| |
|--|
| <p>Urotheliale Tumoren</p> <p>invasive urotheliale Neoplasie</p> <ul style="list-style-type: none"> mit plattenepithelialer Differenzierung mit glandulärer Differenzierung mit trophoblastischer Differenzierung nestförmige Variante mikrozystische Variante mikropapilläre Variante lymphoepitheliomähnliche Variante lymphomähnliche Variante plasmazytoide Variante sarkomatoide Variante riesenzellige Variante undifferenzierte Variante <p>noninvasive urotheliale Neoplasie</p> <ul style="list-style-type: none"> urotheliales Carcinoma in situ nichtinvasive papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrigem malignem Potential nichtinvasives papilläres Urothelkarzinom „low grade“ nichtinvasives papilläres Urothelkarzinom „high grade“ urotheliales Papillom urotheliales Papillom (invertierter Typ) |
| <p>Plattenepitheliale Neoplasien</p> <ul style="list-style-type: none"> plattenepitheliales Papillom Plattenepithelkarzinom verruköses Karzinom |
| <p>Glanduläre Neoplasien</p> <ul style="list-style-type: none"> Adenokarzinom <ul style="list-style-type: none"> mit enteraler Differenzierung mit muzinöser Differenzierung mit siegelringzelliger Differenzierung mit klarzelliger Differenzierung villöses Adenom |
| <p>Neuroendokrine Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> kleinzelliges Karzinom Karzinoid Paragangliom |
| <p>Melanozytäre Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> malignes Melanom Nävus |
| <p>Mesenchymale Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> Rhabdomyosarkom Leiomyosarkom Angiosarkom Osteosarkom malignes fibröses Histiozytom Leiomyom Hämangiom andere |
| <p>Hämatopoetische und lymphatische Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> malignes Lymphom Plasmozytom |
| <p>Verschiedene Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> Karzinom der Skenischen-, Cowper- und Littre-Drüsen Metastasen und Tumorübergriffe von anderen Organen |

1.1.3.2. Grading der Harnblasentumoren

Die Urothelkarzinome der Harnblase werden anhand ihrer zytologischen und histologischen Eigenschaften bezüglich ihres Differenzierungsgrades beschrieben. Weit verbreitet ist die Unterscheidung in G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3-4 (undifferenziert).

Das Grading urothelialer Tumoren wurde in den letzten Jahren mehrfach abgewandelt. Die zuletzt im Jahre 2004 veröffentlichte Nomenklatur der WHO soll sowohl dem biologischen Verhalten als auch den nachweisbaren zytogenetischen und molekularbiologischen Eigenschaften der Tumoren Rechnung tragen. Durch den Wandel der Nomenklaturen wird jedoch die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Nomenklatorsystemen eingeschränkt. In Tabelle 2 wird die aktuelle Nomenklatur im Vergleich zu den relevanten Vorläufergradingsystemen dargestellt.

Tabelle 2: Gegenüberstellung verschiedener Gradingssysteme urothelialer Tumoren (Störkel 2005, Busch und Algaba 2002)

| WHO 1973 | Malström 1987 | ISUP/WHO 1998 | WHO 2004 |
|-----------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Papillom | Grad 1 | Papillom | Papillom |
| Grad 1 | Grad 2A | PUNLMP Low-grade-Karzinom | PUNLMP Low-grade-Karzinom |
| Grad 2 | Grad 2B | High-grade-Karzinom | High-grade-Karzinom |
| Grad 3 | Grad 3-4 | High-grade-Karzinom | High-grade-Karzinom |

1.1.3.3. Die TNM-Klassifikation der Harnblasentumoren

Die Stadieneinteilung der Harnblasenkarzinome erfolgt entsprechend der lokalen Tumorausbreitung (T), dem Nachweis von befallenen regionalen Lymphknoten (N) und dem Nachweis von Fernmetastasen (M) nach der TNM-Klassifikation entsprechend den aktuellen (2002) von der Union International Contre le Cancer (UICC) befürworteten und allgemein anerkannten Regeln (Tabelle 3).

Tabelle 3: TNM-Klassifikation der Harnblasentumoren nach UICC 2002

| | |
|-----------------|--|
| T | Primärtumor |
| T _x | Primärtumor nicht beurteilbar |
| T ₀ | kein Anhalt für Karzinom |
| T _a | nichtinvasives papilläres Karzinom |
| T _{is} | Carcinoma in situ |
| T ₁ | Invasion der Lamina propria |
| T ₂ | Invasion der Detrusormuskulatur |
| T _{2a} | der inneren Detrusorschicht |
| T _{2b} | der äußeren Detrusorschicht |
| T ₃ | Invasion des perivesikalen Fettgewebes |
| T _{3a} | mikroskopisch |
| T _{3b} | makroskopisch |
| T ₄ | Invasion angrenzender Organe |
| T _{4a} | Prostata, Uterus, Vagina, Rektum |
| T _{4b} | Beckenwand, Bauchwand |
| N | regionäre Lymphknoten |
| N _x | nicht beurteilbar |
| N ₀ | keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar |
| N ₁ | solitäre Lymphknotenmetastase (≤ 2 cm) |
| N ₂ | solitäre oder multiple Lymphknotenmetastasen (> 2 cm und ≤ 5 cm) |
| N ₃ | Lymphknotenmetastasen > 5 cm |
| M | Fernmetastasen |
| M _x | nicht beurteilbar |
| M ₀ | keine Fernmetastasen |
| M ₁ | Fernmetastasen |

1.1.4. Diagnostik

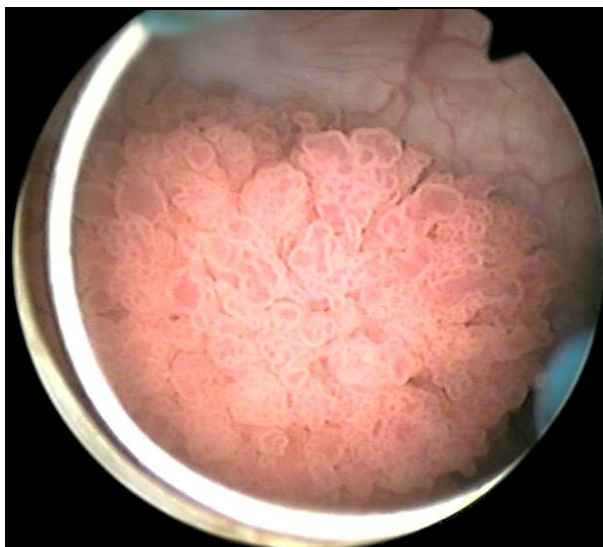
Die Früherkennung des Harnblasenkarzinoms gestaltet sich bei anfangs häufig fehlenden oder nur gering ausgeprägten Symptomen schwierig. Typische Befunde sind die Hämaturie, häufig schmerzlos, sowie relativ selten auftretende oder nur

gering ausgeprägte dysurische Beschwerden. Rezidivierende Harnwegsinfekte können ebenfalls hinweisend sein.

Im Rahmen der Vorfelddiagnostik erfolgt die Anamneseerhebung, die klinische Untersuchung, die Sonographie der Nieren und bei Auffälligkeiten die Durchführung einer Ausscheidungsurographie. Zur notwendigen Basisdiagnostik zählt ebenfalls die Untersuchung des Urins hinsichtlich einer Hämaturie. Dies kann in Form eines Urinsediments oder Urinstreifentests erfolgen. In speziellen Fällen kann die Erythrozytenmorphologie Hinweise auf den Ursprung der Hämaturie geben (Wawroschek und Roth 2003).

Als Standard in der Primärdiagnostik und in der Tumornachsorge ist die Urethrozystoskopie in Kombination mit der Urinzytologie weiterhin unumstritten (Deutsche Krebsgesellschaft 2002, Rathert 2003).

Bei einem tumorverdächtigen zystoskopischen Befund (Beispiel eines endoskopischen Bildes in Abbildung 1) erfolgt im Weiteren die transurethrale Resektion mit



dem Ziel der histologischen Sicherung. Dabei sollen der Tumor selbst, der Tumorgrund sowie Resektionen aus den Randbereichen getrennt zur pathologischen Beurteilung gegeben werden (Deutsche Krebsgesellschaft 2002).

Abbildung 1: endoskopischer Befund eines typischen papillären Harnblasentumors, hier im Rahmen der transurethralen Resektion fotografiert

Methoden zur noninvasiven „uringestützten“ Diagnostik

Die Urinzytologie ist der aktuelle Goldstandard der nichtinvasiven Diagnoseverfahren. Bei gering differenzierten Tumoren („high-grade“) einschließlich dem Carcinoma in situ kann eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig guter Spezifität

erreicht werden. Bei gut differenzierten Befunden liefert die Urinzytologie jedoch häufig falsch negative Befunde.

Vor dem Hintergrund der Defizite der konventionellen Zytologie wurden in den letzten Jahren eine Reihe alternativer nichtinvasiver Tumortestverfahren entwickelt (Beispiele in Tabelle 4).

Tabelle 4: Beispiele urinbasierender nichtinvasiver Tumortestverfahren

| Zellbasierende Urintestverfahren | |
|--|---|
| Testverfahren | Nachweisziel und Erläuterung |
| Immunzyt | Markierung maligner Urothelzellen durch fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper. Die Auswertung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. |
| Telomeraseaktivität ³⁾ | Telomerase Im Rahmen der Zellteilung kommt es bei der DNA Replikation regelhaft zu einer Verkürzung der Telomere. Dies ist ein Teil des normalen Alterungsprozesses. Die Telomerase ist ein Enzym, welches der Erhaltung der Telomerlänge dient und nur in Keim- und Tumorzellen vorkommt. |
| FISH | in dieser Arbeit dargestellt |
| Proteinbasierende Urintestverfahren | |
| Testverfahren | Nachweisziel und Erläuterung |
| BTastat ²⁾ BTAttrak ¹⁾ | Humanes komplementfaktor-H-assoziiertes Protein wird an der Basalmembran als Reaktion auf den Tumor vermehrt exprimiert. |
| NMP22 ¹⁾ NMP22 BladderChek ²⁾ | Nukleäres Matrixprotein Ein Protein des nukleären Spindelapparats welches wahrscheinlich von Tumorzellen während der Apoptose freigesetzt wird. Die intrazelluläre Konzentration von NMP22 ist in Urothelkarzinomzellen höher als in normalen Urothelzellen. |
| HA/HAase ¹⁾ | Hyaluronsäure (HA) und Hyaluronidase (HAase) HA ist ein Bestandteil vieler Körpergewebe mit Vorkommen in Matrixgewebe und Gewebeflüssigkeit. HAase ist am Abbau von HA beteiligt und lässt sich im Tumorgewebe in erhöhter Konzentration nachweisen |
| UBC UBC Rapid CYFRA 21-1 | Zytokeratine (CK) Zytokeratine sind Proteine des Stützapparats der Zellen. Die Konzentration einiger (wie CK18, CK20, CYFRA21-1) ist im Urin von Blasen tumorpatienten erhöht, jedoch nicht tumorspezifisch. |
| FDP-Test ²⁾ | Fibrinolyseprodukte (FDP) Aufgrund der erhöhten Gefäßpermeabilität im Tumorgewebe kommt es zu einem vermehrten Austritt von Plasminogen und Fibrinogen in die Umgebung des Tumors, woraus lokal Plasmin und Fibrin entstehen. Beim Abbau von Fibrin werden sogenannte Fibrinolyseprodukte frei. Der Test ist nicht tumorspezifisch. |
| ¹⁾ quantitativer Immunassay (ELISA), ²⁾ qualitativer Schnelltest, ³⁾ Nachweis mittels PCR; BTA: Bladder-Tumor-Antigen, FDP: fibrin degradation products | |

Im Grundprinzip unterscheiden sind zellbasierende Tests, die urotheliale Epithelzellen charakterisieren, von proteinbasierenden Tests, die von Blumentumoren vermehrt exprimierte oder vermehrt freigegebene Substanzen nachweisen (Tritschler et al. 2006).

Durch diese Verfahren sollen auf der einen Seite die Primärdiagnostik und das Verlaufsdispenser vereinfacht und für den Patienten komfortabler gestaltet werden. Auf der anderen Seite erwartet man von diesen Tests prognostische Aussagen über den Krankheitsverlauf und über das Ansprechen auf eine zusätzliche zytostatische oder immunmodulierende Therapie.

Im Idealfall könnten anhand von molekularen Prognosemarkern frühzeitig die therapeutischen Weichen hinsichtlich einer adjuvanten lokalen Chemo- oder Immuntherapie, eines radikal tumorchirurgischen Vorgehens oder einer adjuvanten medikamentösen systemischen Therapie gestellt werden (Retz und Lehmann 2005).

1.1.5. Therapie

Für die Festlegung des Therapieregimes sind neben genauen Informationen über die lokale Tumorausbreitung (T-Kategorie) und den Differenzierungsgrad (Grading) Kenntnisse über weitere Charakteristika des Tumors, wie Rezidivneigung und Multifokalität notwendig. Großen Einfluss auf die Therapieplanung haben zudem das biologische Alter des Patienten, dessen Allgemeinzustand und seine Therapietreue. Bei einem sogenannten nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinom (Ta, T1, Tis) ist prinzipiell eine lokale, blasenerhaltende Therapie anzustreben. Bei muskelinvasiven Tumorbefunden (ab T2a) oder ausgedehntem Befall der Harnblase ist die radikale Zystektomie bei organbegrenzten Befunden als Standardtherapie anzusehen.

Das Standardverfahren in der Therapie **nicht muskelinvasiver Harnblasenkarzinome** ist die komplette transurethrale Resektion (TUR-B) der Befunde. Diese hat neben der therapeutischen Funktion auch eine diagnostische Bedeutung im Sinne der histologischen Sicherung.

Dabei erfolgt die getrennte Resektion des Tumors selbst, des Tumorgrundes und der Tumorränder. Die damit gewonnenen Gewebespäne gehen als separate Präparate zur histologischen Untersuchung. Die Tumorgrundresektion muss die

Harnblasenmuskulatur mit einschließen. Nur dadurch kann eine Beurteilung der Tiefeninfiltration, insbesondere mit Blick auf die für den klinischen Alltag wichtige Frage nach eventuell muskelinvasivem Tumorwachstum, erfolgen.

Probleme ergeben sich bei der Resektion, wenn ein Carcinoma in situ (Tis) vermutet wird. (Zum Beispiel bei auffälliger Urinzytologie ohne Nachweis eines exophytischen Tumorwachstums) Die makroskopische Abgrenzung verdächtiger Areale ist aufgrund der intraepithelialen Ausbreitung dieses Tumors nicht sicher möglich. In diesen Fällen wird ein sogenanntes „Blasenmappig“ (diagnostische Resektionen an mehreren Stellen der Harnblase) empfohlen (Oosterlinck et al. 2002). Durch die Kombination der Resektion mit einer photodynamischen Diagnostik (PDD) nach 5-Aminolaevolinsäure-Instillation in die Harnblase (PDD-TUR-B) kann die Detektion von Arealen mit einem Carcinoma in situ deutlich verbessert werden. Auch für das Auffinden papillärer Befunde ist diese Technik vorteilhaft. So lässt sich durch eine PDD-TUR-B das Risiko von Residualtumoren deutlich verringern und das rezidivfreie Überleben signifikant verlängern. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Kombination beider Methoden der alleinigen „Weißlicht-Zystoskopie“ überlegen ist (Filbeck et al. 2003, Hungerhuber et al. 2007). Es handelt sich zwar noch nicht um eine in den Leitlinien empfohlene Methode. Die Anwendung wird jedoch aufgrund der diagnostischen Überlegenheit durch den Arbeitskreis Onkologie der Deutschen Gesellschaft für Urologie empfohlen (Stenzl et al. 2008). Eine Übernahme in die bisher seit Oktober 2001 nicht aktualisierten Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Urologie ist zu erwarten.

Nach erfolgter TUR-B sollte eine einmalige intravesikale Instillation eines Zytostatikums innerhalb von 24 Stunden erfolgen („Frühinstillation“). Dies soll die Implantation flottierender Tumorzellen und das Auftreten von Rezidiven verhindern.

Aus Sicherheitsgründen wird im Abstand von einer bis sechs Wochen nach erfolgter TUR-B mit Nachweis eines nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms eine sogenannte Nachresektion empfohlen. Diese ist bei T1 Tumoren obligat. Fakultativ gilt diese Empfehlung auch für Ta Tumoren.

Abhängig von prognostisch relevanten Eigenschaften des diagnostizierten Tumors wird die Indikation zur adjuvanten Instillationstherapie im Sinne einer Erhaltungstherapie gestellt. Diese erfolgt mit dem Ziel, das rezidivfreie Intervall zu verlängern, die Tumorprogression zu verhindern und beim Carcinoma in situ eine

Remission der Tumorerkrankung zu bewirken. Bei Befunden mit niedrigem Progressionsrisiko gilt die lokale Applikation von Chemotherapeutika (z.B. Mitomycin C, Doxorubicin) als gleichwertig mit einer Immuntherapie mit BCG (Bacillus Calmette-Guérin). Bei hohem Risiko für eine Progression (G3 Tumoren, Rezidivbefunde, Carcinoma in situ) sollte BCG bevorzugt werden (Deutsche Krebsgesellschaft 2002). Tabelle 5 zeigt eine Synopsis für das Management nicht muskelinvasiver Urothelkarzinome der Harnblase in Anlehnung an die Empfehlungen der DGU.

Tabelle 5: Übersicht zum Management nicht muskelinvasiver Urothelkarzinome der Harnblase entsprechend der AWMF-Leitlinie zum Harnblasenkarzinom

| Tumor | | „Früh- instillation“ | weitere operative Therapie | adjuvante Therapie |
|-------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| pTa | G1 (Primärbefund) | empfohlen empfohlen empfohlen | Nach TUR-B (fakultativ) | nicht empfohlen |
| | G1 (Rezidiv) | | Nach TUR-B (fakultativ) | empfohlen |
| | G2 | | Nach TUR-B | empfohlen |
| | G3 | | Nach TUR-B | empfohlen (BCG) |
| pT1 | G1 | empfohlen | Nach TUR-B | empfohlen |
| | G2 | empfohlen | Nach TUR-B | empfohlen |
| | G3 (Primärbefund) | empfohlen | Nach TUR-B | empfohlen (BCG) |
| | G3 (Rezidiv) | | Zystektomie | |
| pTis | G3 (Primärbefund) | | Blasenmapping (nach 2 Zyklen BCG) | empfohlen (BCG) |
| | G3 (Rezidiv/Rest) | | Zystektomie | |

Einschränkend ist jedoch zu beachten, dass die von den beteiligten deutschen Fachgesellschaften im Rahmen der AWMF-Leitlinien verfassten Empfehlungen im Gegensatz zu den Empfehlungen auf europäischer Ebene seit 2001 nicht aktualisiert worden sind. Die jährlichen Empfehlungen der EAU, in Anlehnung an Studienergebnisse der EORTC, sehen die Indikation zur Instillationstherapie strenger als in den deutschen Leitlinien. Auch wird hier die primäre Zystektomie bei Hochrisikotumoren als gleichberechtigte Alternative dargestellt, welche im Einzelfall zu diskutieren ist (Babjuk et al. 2008).

10 – 20 % der Harnblasenkarzinome zeigen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein muskelinvasives Wuchsverhalten ohne Nachweis von Lymphknoten- oder Fernmetastasen.

Bei diesen organbegrenzten **muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen** ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie die Behandlung der Wahl. Diese umfasst beim Mann die Entfernung der Harnblase, der distalen Ureteren, der Prostata, der Samenblasen und der proximalen Samenleiter sowie bei Tumorbefall

der Harnröhre. Bei der Frau erfolgt zusätzlich zur Entfernung der Harnblase und der distalen Harnleiter die Hysterektomie unter Mitnahme des proximalen ventralen Scheidendrittels. Abhängig vom Tumorbefall und der geplanten Form der Harnableitung erfolgt die Exstirpation der Harnröhre.

Im Rahmen der Zystektomie ist es notwendig, die Patienten mit einer Harnableitung zu versorgen. Der wichtigste dabei zu beachtende Gesichtspunkt ist der Schutz des oberen Harntraktes und damit die Erhaltung der Nierenfunktion. Als weitere wichtige Punkte sind dabei Lebensqualität (kontinente oder inkontinente Harnableitungsform) und Funktionalität der Harnableitungsform zu beachten. In diese komplexe Entscheidung muss der Patient mit einbezogen werden.

Bei **lokal fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen oder metastasierter Erkrankung** muss in Abhängigkeit von der Gesamtsituation über palliative Therapiekonzepte entschieden werden. Hierfür kommt zur Vermeidung lokaler Komplikationen (rezidivierende Makrohämaturie, Harnstauungsniere) eventuell eine Blasenentfernung mit Harnableitung unter nicht kurativem Therapieansatz in Frage. Möglicherweise muss als Dauerlösung eine Ableitung der Nieren mittels perkutaner Nephrostomie erwogen werden. Lokale Maßnahmen bei fortgeschrittenem Tumorleiden mit Blutungskomplikationen wie transurethrale Koagulation des Tumors, Embolisation der Arteria iliaca interna oder Instillation von Alaun- oder Formalinlösung in die Blase kommen ebenfalls in Frage, sind aber meist nur von vorübergehendem Erfolg.

Als Standard der systemischen Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms gilt heute die Kombination von Cisplatin und Gemcitabin. Diese löste bei deutlich günstigerem Nebenwirkungsprofil und nahezu gleicher Ansprechrate die zuvor breit angewandte Viererkombination von **Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin** oder **Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin und Cisplatin** (MVAC, MVEC) ab.

Eine neue Perspektive in der systemischen Behandlung des Urothelkarzinoms bietet die sogenannte „**targeted therapy**“ (englisch, mögliche sinngemäße Übersetzung: „zielgerichtete (Krebs)therapie“). Im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie werden dabei nicht einfach sich schnell teilende Zellen attackiert, sondern an spezifischen Molekülen der Signaltransduktion der Tumorzellen angegriffen, um so in die im Rahmen der Karzinogenese gestörten Regulationsmechanismen der Zelle

eingzugreifen. In den letzten Jahren sind durch molekularbiologische Forschungen Fortschritte in der Identifikation relevanter Mechanismen und möglicher „targets“ (englisch: Ziele) gemacht worden. Bisher hat die „targeted therapy“ beim Harnblasenkarzinom jedoch keine Bedeutung im klinischen Alltag erlangt. Sie wird aktuell nur in verschiedenen Phase I und II Studien angewandt. Die Idealvorstellung für die Zukunft ist eine am genetischen Tumorprofil adaptierte medikamentöse Tumorthherapie (Mitra et al. 2006).

1.1.6. Prognose

Bei den Aussagen über die Prognose von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom muss zunächst zwischen nicht muskelinvasiven Befunden und den muskelinvasiven Befunden unterschieden werden. Weiterhin spielt die Therapieform eine entscheidende Rolle.

Bei den nicht muskelinvasiven Tumoren stehen die Neigung zu Rezidiven und das Risiko zur Progression (die Entwicklung hin zu einem muskelinvasiven Tumor) im Vordergrund. Das Rezidivrisiko ist abhängig von der Infiltrationstiefe (T), der Multifokalität, der Tumorkonfiguration (papillär oder solide) und der Tumoranamnese (Primärbefund oder Rezidiv). Die Art der lokalen adjuvanten Therapie scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen.

Ein frühes Tumorrezidiv (nach drei Monaten) und schlecht differenzierte Tumoren haben ein erhöhtes Progressionsrisiko (Ali-EI-Dein et al. 2003).

Die Prognose nach radikaler Zystektomie korreliert mit dem definitiven Tumorstadium und dem Nachweis von Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Bei einem auf die Harnblase beschränkten Tumor (pTa – pT3a) ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen ist ein Fünfjahresüberleben von etwa 80 % zu erwarten. Bei Tumorkategorien größer pT3a sinkt es bereits auf unter 50 %. Mit dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen, unabhängig von der lokalen Tumorkategorie, verschlechtert sich die Prognose nochmals deutlich (Fünfjahresüberleben ca. 30 %) (Louie-Johnsun et al. 2007, Stein und Skinner 2003).

Beim Vorliegen von Fernmetastasen beträgt das mediane Überleben drei bis sechs Monate. Dieses kann durch eine Polychemotherapie lediglich auf 12 – 14 Monate erhöht werden (Bellmunt et al. 2003).

1.1.7. Genetische Veränderungen

Die Karzinogenese ist ein äußerst komplexer, bis heute nur teilweise verstandener Vorgang, bei dem eine normale Zelle des Organismus in eine Tumorzelle transformiert wird. Hierbei erlangt sie aufgrund von komplexen Veränderungen in ihrer Zellphysiologie Fähigkeiten, die sie in die Lage versetzen, die regulären Steuermechanismen der Zellteilung, des programmierten Zelltodes (Apoptose) und der Einschränkung des Zellteilungspotentials zu umgehen. In der Folge wird das dynamische Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose gestört, wodurch es zu einer unkontrollierten Zellvermehrung kommt. Des Weiteren können maligne Zellen die Gefäßneubildung stimulieren (Tumorangiogenese), die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und schlussendlich zur Metastasierung erlangen (Hanahan und Weinberg 2000).

Die meisten Tumoren sind monoklonalen Ursprungs. Es wird heute davon ausgegangen, dass eine Mutation, welche nicht repariert werden kann und welche auch nicht dazu führt, dass diese Zelle durch den programmierten Zelltod eliminiert wird, den Ausgangspunkt der Entwicklung maligner Tumoren darstellt. Die genetischen Veränderungen werden dann an die Tochterzellen vererbt. Zur Erlangung der oben beschriebenen besonderen Fähigkeiten der Tumorzellen ist die Akkumulation weiterer Mutationen im Sinne des Konzeptes der Mehrschrittkarzinogenese Voraussetzung. Erst damit ist die Entstehung von invasiven und zur Metastasierung befähigten Tumoren möglich (Kassen und Hofmockel 2000).

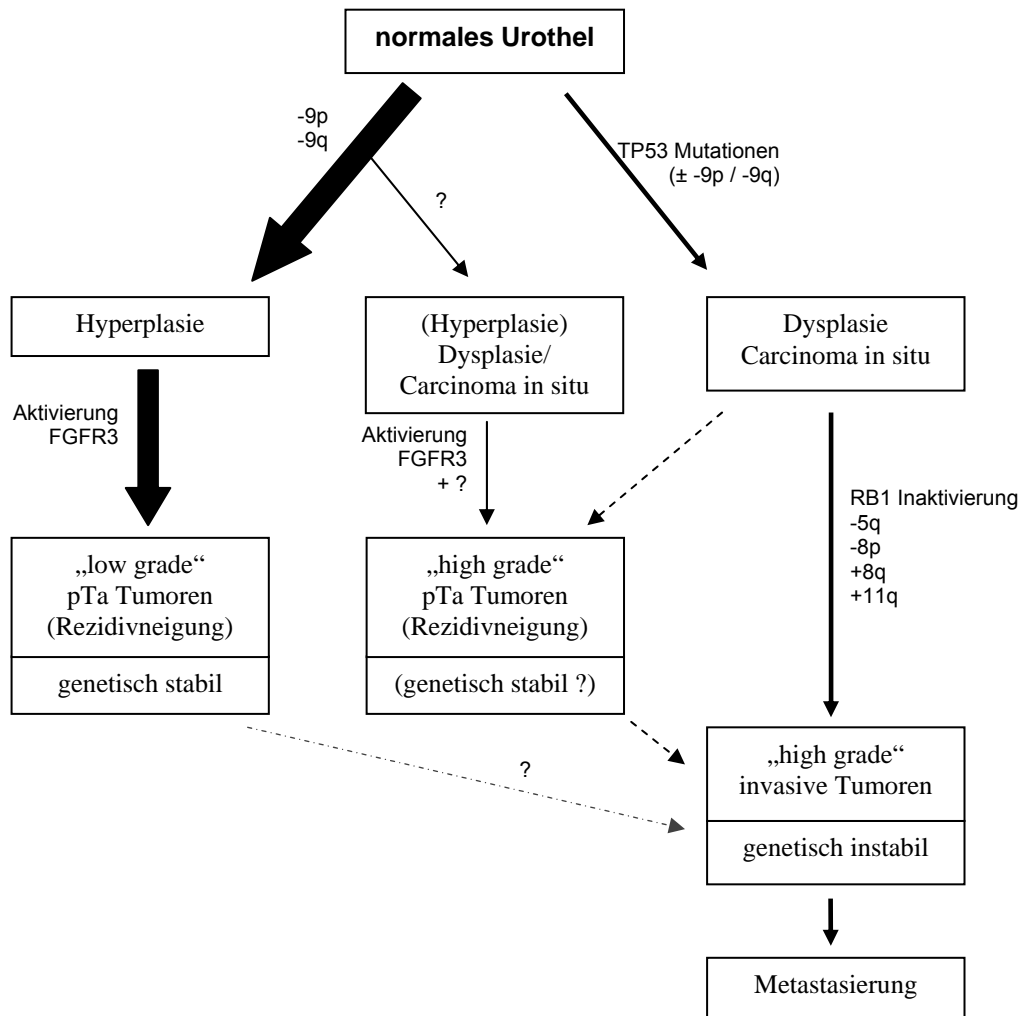
Entstehung des Urothelkarzinoms

Die genauen molekularbiologischen Abläufe bei der Entstehung von Urothelkarzinomen sind nur unvollständig bekannt. Es wird wie bei anderen malignen Tumoren von einer Mehrschrittkarzinogenese ausgegangen.

Mit Blick auf das biologische Verhalten und die genetischen Veränderungen kann man zwei unterschiedliche Entstehungswege mit unterschiedlicher klinischer Prognose beobachten. So gibt es auf der einen Seite die prognostisch günstigen, nicht muskelinvasiven, papillären und gut differenzierten Urothelkarzinome mit einer hohen Rezidivneigung und häufigem multifokalem Vorkommen. Zu unterscheiden sind davon die aggressiven, schlecht differenzierten und zum invasiven

Wuchsverhalten neigenden Tumoren mit ungünstiger Prognose. Intermediär ist die Rolle des zwar nicht muskelinvasiven jedoch schlecht differenzierten und hochgradig aggressiven Carcinoma in situ einzustufen (Al-Sukhun und Hussain 2003).

Abbildung 2: Mögliche Pfade der Entstehung von Urothelkarzinomen (modifiziert nach Knowles 2006)



Molekularbiologische Erkenntnisse unterstützen die Hypothese der differenten Tumorguppen mit unterschiedlichen Entwicklungswegen. Der eine Weg führt von einer urothelialen Hyperplasie hin zu gut differenzierten und chromosomal stabilen, stark proliferierenden und zu Rezidiven neigenden papillären „low grade“ Ta- und zu den schwierig einzuordnenden „low grade“ T1-Tumoren („**low-grade-pathway**“). Nur selten entwickeln sich hieraus entdifferenzierte muskelinvasive Tumoren. Der andere Weg („**high-grade-pathway**“) hingegen führt entweder über genetisch instabile

Urotheldysplasien zu papillären „high grade“ Tumoren mit der Möglichkeit zu invasivem Wachstum oder über ein Carcinoma in situ zu entdifferenzierten muskelinvasiven Tumoren (Abbildung 2) (Knowles 2006). Diese zwei Entstehungswege sind durch spezifische, von einander differente genetische Veränderungen gekennzeichnet.

In einer Vielzahl von Arbeiten wurden bekannte Tumorsuppressorgene und Onkogene hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Entwicklung von Urothelkarzinomen untersucht. Aus der differenzierten Betrachtung von unterschiedlichen Tumoren konnten Vermutungen über den Zusammenhang von genetischen Ereignissen, dem Tumorgrad und der Invasionstiefe geäußert werden (Knowles 1999).

Im Folgenden werden die wichtigsten genetischen und epigenetischen Veränderungen, denen eine Bedeutung bei der Entwicklung von Urothelkarzinomen zugeschrieben werden und deren genaue Mechanismen nicht immer bekannt sind, getrennt nach „high grade“ und „low grade“ Tumoren, dargestellt.

In der Gruppe der **nicht muskelinvasiven „low grade“ Urothelkarzinome** finden sich, abgesehen von Mutationen des FGFR3 (Rezeptor des „Fibroblasten-Wachstumsfaktors“) und Verlusten auf dem Chromosom 9, nur wenige molekulare Veränderungen.

Den Ausfall eines Alleles eines Gens, zum Beispiel aufgrund einer Mutation, bezeichnet man als „Loss of heterozygosity“ (LOH). LOH im Bereich des Chromosoms 9 findet sich bei mehr als der Hälfte der Urothelkarzinome der Harnblase, unabhängig von Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad (Tsai et al. 1990, Cairns et al. 1993, Linnenbach et al. 1993).

Häufig ist das komplette Chromosom betroffen, so dass ein Ausfall von dort codierten Tumorsuppressorgenen die Folge ist. Die entsprechenden Regionen konnten beiden Armen (9p und 9q) zugeordnet werden. Hier werden als „Kandidatengene“ CDKN2A/ARF, CDKN2B, PTCH, DBC1 und TSC1 vermutet. Bei kleinen primär papillären Tumoren wurden initiale kleine Deletionen beobachtet zu denen im Verlauf weitere hinzukommen und die so kumulieren (Lee et al. 2001, van Tilborg et al. 2000, Louhelainen 2000, Simoneau et al. 1999).

Im Einzelnen finden sich diese Verluste auf dem **p-Arm** im CDKN2A/ARF-Gen (9p21), welches für zwei Proteine (p16 und p14^{ARF}) codiert. p16 ist ein Negativregulator im Rb- und p14^{ARF} im p53-Pathway. Bei Urothelkarzinomen sind beide Gene häufig gleichzeitig in Folge einer homozygoten Deletion deaktiviert. Der Nachweis von LOH in 9p21 findet sich häufiger bei "low grade" Tumoren als bei muskelinvasiven-Tumoren (Chapman et al. 2005). Anhand von In-vitro-Untersuchungen an Mauszellen wurde vermutet, dass der haploide Verlust zur Entwicklung von Urothelkarzinomen beitragen kann (Carneo et al. 2000).

Weiterhin finden sich häufig Mutationen des FGFR3-Gens (4p16). Bis zu 80% der nichtinvasiven „low grade“ Tumoren weisen diese Mutationen auf (Billerey et al. 2001). Bei muskelinvasiven Tumoren lassen sich diese jedoch nicht finden. Junker et al. (2008) beschreiben ein Vorkommen lediglich bei Ta- und gut differenzierten T1-Tumoren. Man findet sie zudem in urothelialen Papillomen (van Rhijn et al. 2002), was die Vermutung nahe legt, dass diese auch Vorstufen der Ta-Tumoren darstellen könnten. Dies ist jedoch nicht abschließend belegt. Als verantwortlicher Mechanismus wird eine durch die Mutation ausgelöste Aktivierung der Rezeptorkinase angesehen (Ornitz und Itoh 2001), welche wiederum die Aktivierung des MAP-Kinase- und des PI3-Kinase-Signalweges bewirkt. Der mehrstufige MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg reguliert unter anderem verschiedene Mechanismen der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose. Der PI3-Kinase-Signalweg greift in verschiedene Zellfunktionen, wie zum Beispiel Zellwachstum, -proliferation und -migration sowie Differenzierung, Zellüberleben und -adhäsion ein.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass FGFR3- und Protoonkogen-Mutationen der Ras-Gen-Gruppe (HRAS (11p15), NRAS(1p13), KRAS2 (12p12)) bei Urothelkarzinomen nicht gemeinsam vorkommen, obwohl Tumoren mit diesen Veränderungen ein ähnliches biologisches Verhalten (nichtinvasiv, „low grade“) aufweisen. FGFR3-Gen- oder Ras-Gen-Mutation konnten in 82 % der „low grade“ Tumoren gefunden werden. Somit lassen sich hier zwei wichtige Entwicklungswege in dieser Tumorengruppe vermuten (Jebar et al. 2005).

Ebenso sind FGFR3- und TP53-Mutationen kaum gleichzeitig anzutreffen. Diese Veränderungen korrelieren jedoch zu völlig unterschiedlichen Tumorqualitäten, so dass hier die Trennlinie zu den muskelinvasiven „high grade“ Tumoren zu ziehen ist (Bakkar et al. 2003, van Rhijn et al. 2004).

Die mRNA-Expression des auf dem **q-Arm** (9q22) codierten Gorlin Syndrom Tumorsuppressorgens (PTCH) ist häufig bei Urothelkarzinomen reduziert (Aboukassim et al. 2003). Mutationen dieses Gens finden sich jedoch nur unregelmäßig (McGarvey et al. 1998).

Bei einigen Urotheltumoren wurde eine homozygote Deletion von DBC1 (9q33) gefunden (Stadler et al. 2001, Nishiyama et al. 1999), häufiger jedoch fand sich eine Transkriptionsverminderung durch eine Hypermethylierung der Promotorregion (Habuchi et al. 2001, Habuchi et al. 1998). Die Funktion dieses Gens ist bisher weitestgehend unklar. Bei ektopter Transkription wurde die Auslösung eines nichtapoptotischen Zelltodes (Wright et al. 2004) oder ein Verharren in der G1 Phase (Nishiyama et al. 2001) beschrieben. Neueste Untersuchungen konnten eine inhibierende Wirkung auf das antiapoptotisch wirkende SIRT1-Protein und damit eine stimulierende Wirkung auf den Apoptosepathway über eine verminderte p53-Deacetylierung nachweisen (Anantharaman und Aravind 2008).

Mutationen des „Tuberöse sclerose Komplexes“ des TSC1-Gens (9q34) ließen sich bei 13 % der Harnblasentumoren finden (Knowles et al. 2003, Hornigold et al. 1999). Das Genprodukt Hamartin interagiert zusammen mit dem Genprodukt von TSC2 (Tuberin) im PI3-Kinase-Pathway als Negativregulator an dem zentralen Steuermolekül in der Regulation von Proteinsynthese und Zellwachstum mTOR (Manning und Cantley 2003).

Zu den bereits beschriebenen Deletionen auf Chromosom 9 konnten für die **muskelinvasiven „high grade“ Urothelkarzinome** eine Vielzahl weiterer chromosomaler Aberrationen gefunden werden. Nur zum Teil sind die dort kodierten Gene bekannt. Über deren genaue Funktion gibt es nur lückenhafte Kenntnisse.

Eine Gruppe stellen **Onkogene** als Ziel dieser Veränderungen dar. Einige mehr oder weniger verstandene Ereignisse aktivieren den MAPK- und/oder den PI3-Signalweg. Für die Rezeptortyrosinkinase ERBB2 (17q23) der EGFR-Gruppe ließen sich in 10 - 20 % eine Amplifikation und in 10 – 50 % der invasiven Tumoren eine vermehrte Expression finden (Coombs et al. 1991, Sauter et al. 1993, Gardiner et al. 1992, Chow et al. 2001). Für den EGF-Rezeptor wurde in 30 - 50 % von einer Überexpression, nur selten von einer Amplifikation bei invasiven Urothelkarzinom berichtet. Diese korreliert mit einer schlechten Prognose (Neal et al. 1990).

In verschiedenen RAS-Genen finden sich ebenfalls Mutationen. Hier herrscht jedoch Uneinigkeit, ob eine Assoziation mit nicht invasivem oder invasivem Tumorwachstum besteht. So ließ sich zum Beispiel bei in vitro Versuchen an humanen Tumorzelllinien eine HRAS-bedingte Hochregulation von EGFR mit dem Ergebnis eines invasiven Phänotyps beobachten (Theodorescu et al. 1990, Theodorescu et al. 1991). Am Mausmodell hingegen führte eine HRAS-Mutation oft zu nichtinvasiven Tumoren (Zhang et al. 2001).

Das „murine double minute Onkogen“ MDM2 (12q14) scheint ebenfalls in die p53-Funktion einzugreifen, indem eine Überexpression zur Verminderung der p53-Funktion führt. Es wurde in 4 - 6 % der Urothelkarzinome eine Amplifikation von MDM2 beschrieben (Habuchi et al. 1994). Einheitliche Aussagen über die Beziehung zum Staging, Grading und zur Prognose sind nicht verfügbar (Schmitz-Dräger et al. 1997, Pfister et al. 1999, Tuna et al. 2003).

Für das MYC-Gen (myelocytomatosis viral oncogene) konnte in vielen Urothelkarzinomen eine vermehrte Expression beobachtet werden (Schmitz-Dräger et al. 1997). Der genaue Mechanismus ist weitestgehend unklar. Eventuell geschieht dies in Folge des Einflusses anderer Ereignisse bei der Entwicklung von Urothelkarzinomen, zum Beispiel im Rahmen der Aktivierung des MAPK-Signalweges.

Des Weiteren lassen sich Amplifikationen von 6p, welches das E2F3-Gen (6p22) enthält, in Urothelkarzinomzelllinien nachweisen (Feber et al. 2004, Hurst et al. 2004, Oeggerli et al. 2004). E2F transcription factor 3 (6p22) aus der E2F-Transkriptionsfaktorenfamilie interagiert mit dem Rb-Signalweg. Bei 14,3 % der invasiven Urothelkarzinome ließ sich eine Amplifikation von E2F3 nachweisen (Oeggerli et al. 2004).

Zu den bekannten **Tumorsuppressorgenen**, die an der Entwicklung von invasiven Urothelkarzinomen beteiligt sind, gehören zum Beispiel TP53, RB1, CDKN2A/ARF und PTEN. Durch Veränderungen in diesen Genen kommt es zu einer Alteration der interagierenden Regulationsmechanismen des p53- und des Rb-Signalweges,

welcher unter anderem für die Kontrolle des Zellzyklus und der Stressantwort der Zelle von Bedeutung sind.

Für das Tumorsuppressorgen TP53 (17p13.1) lassen sich in vielen muskelinvasiven Tumoren Mutationen nachweisen (Habuchi et al. 1993, Sidransky et al. 1991, Spruck et al. 1993, Fujimoto et al. 1992, Williamson et al. 1994). Die verlängerte Halbwertszeit des Genproduktes p53 stellt ein Indiz für eine solche Mutation dar (Esrig et al. 1993). In einige Studien ließen sich Korrelationen der p53-Akkumulation mit einer negativen Prognose unabhängig vom Tumorgrad nachweisen (Esrig et al. 1994, Sarkis et al. 1994, Sarkis et al. 1993). In einer Metaanalyse über 3000 Tumoren fand sich hingegen nur einen geringen Zusammenhang mit einer schlechten Prognose (Schmitz-Dräger et al. 2000).

Eine verminderte Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-inhibitor p21 (6p21.2), CDKN1A, welche zu einer Verminderung der p53-Produktion führt, scheint mit einer Tumorprogression zu korrelieren (Chatterjee et al. 2004, Shariat et al. 2004).

Für eine homozygote Deletion, einen LOH oder den Verlust der Proteinexpression des Rb1-Gens (13q14) wurden Korrelationen mit „high grade“ und muskelinvasiven Tumoren gefunden (Cairns et al. 1991, Cordon-Cardo et al. 1992, Logothetis et al. 1992, Xu et al. 1993).

Häufig findet sich bei „high grade“ und muskelinvasiven Urothelkarzinomen ein LOH in der Region 10q23 von PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) (Aveyard et al. 1999, Kagan et al. 1998). Es wird vermutet, dass es durch eine Verminderung der PTEN-Aktivität, einem Negativregulator des PI3-Kinase-Pathway, zu einer Aktivierung dieses Signalweges kommt.

Viele weitere genetische Veränderungen sind für muskelinvasive „high grade“ Urothelkarzinome beschrieben worden. Hierzu zählen Verluste von 2q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 18p und Y. Zum Teil sind detaillierte Informationen zu Regionen und Imbalancen verfügbar (Blaveri et al. 2005, Koed et al. 2005, Veltman et al. 2003). Zugewinne finden sich auf 1q, 5p, 8q und 17q und sind oft mit hochgradigen Amplifikationen verbunden. Die entsprechenden Targetgene sind jedoch bisher nicht identifiziert.

Diese Tumoren weisen eine hohe genetische, hauptsächlich chromosomale Instabilität auf. Mikrosatelliteninstabilitäten finden sich selten (Gonzalez-Zulueta et al. 1993, Koed et al. 2005).

Die genetischen Unterschiede zwischen T1 und den muskelinvasiven Tumoren sind nicht signifikant, obwohl die T1-Befunde vom klinischen Bild her eine deutlich bessere Prognose haben. Wahrscheinlich ist dies jedoch durch deren oft mögliche komplette endoskopische operative Entfernung und nicht durch eine geringere Aggressivität zu erklären.

Des Weiteren sind genetische Veränderungen bekannt, die mit einem Tumorprogress assoziiert sind. Diese sind Zugewinne von 3p22-25 und 5p und Verluste von 4p11-15, 5q15-23, 6q22-23 und 10q24-26 (Richter et al. 1999).

Signifikante genetische Unterschiede von muskelinvasiven aber nicht metastasierten Tumoren und metastasierten Tumoren sind bisher nicht bekannt (Hovey et al 1998).

Dem **Carcinoma in situ (CIS)** kommt sowohl vom klinischen Bild her, als auch von der verfügbaren Datenlage eine besondere Rolle zu. Hierzu sind nur wenige genetische Untersuchungen verfügbar. Erklärbar ist dies am ehesten durch die problematische Materialgewinnung bei diesen fragilen, meist nur „kleinvolumigen“ Tumoren.

Dysplasie und CIS weisen oft TP53-Mutationen und selten Verluste auf Chromosom 9 auf (Spruck et al. 1994). Eine scheinbar im Widerspruch stehende Folgestudie fand jedoch auch Verluste auf Chromosom 9 und genetische Veränderungen wie bei invasiven Tumoren (Rosin et al. 1995). Abschließend lässt sich diese Problematik in Anbetracht der geringen Datenlage nicht bewerten. Die Konstellation lässt jedoch vermuten, dass zwei differente Entwicklungswege mit differenten Carcinomata in situ existieren. Zum einen das „primäre CIS“ (ohne Chromosom-9-Verluste) und zum anderen das CIS, welches in der Umgebung von papillären Tumoren gefunden wird (Hopman et al. 2002). Hieraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass das CIS mit Chromosom-9-Verlusten eine Vorstufe der papillären Tumoren darstellt.

Basierend auf den beschriebenen Erkenntnissen über die genetischen Veränderungen bei der Entstehung von Urothelkarzinomen wurde auf der Grundlage der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ein uringebundenes Diagnostiksystem entwickelt. Mit der Kombination aus vier verschiedenen DNA-Sonden soll der

Nachweis von prägnanten tumorspezifischen Veränderungen an Zellen im Urin mit einem gut anwendbaren Diagnosewerkzeug ermöglicht werden (Sokolova et al. 2000).

Hiermit gelang, mit einem vertretbaren technischen Aufwand, der molekularen Diagnostik der Einzug in die Routineuntersuchungen beim Urothelkarzinom. Damit konnte ein Brückenschlag zwischen der experimentellen Forschung über die angewandte Wissenschaft hin zum klinischen Alltag erfolgen.

2. Fragestellung und Ziele

In der Diagnostik des Urothelkarzinoms der Harnblase sowohl bei primärem Tumorverdacht, als auch im Rahmen der Tumornachsorge stellt die Zystoskopie als invasive Untersuchung den Goldstandard dar.

Es ist unbestritten, dass moderne nichtinvasive Diagnostikmethoden bisher keine Alternative darstellen können. Die verschiedenen Verfahren zeigen eine mediane Sensitivität von 40 – 85 % bei einer medianen Spezifität von 61 – 92 %. Die Sensitivität der mFISH wird in verschiedenen Arbeiten mit 39 – 87 % beschrieben, die Spezifität mit 85 – 100 %. Aufgrund dieser hohen Schwankungsbreite ist bisher die Bedeutung der mFISH in der Diagnostik des Urothelkarzinoms nicht klar definiert.

Die vorliegende Arbeit soll den diagnostischen Stellenwert einer mFISH Untersuchung von Zellen im Urin bei Patienten mit zystoskopisch tumorverdächtigen Harnblasenbefunden anhand der Ergebnisse unseres Patientengutes überprüfen, um eine Einordnung der Methode in die Standarddiagnostika Urinzytologie und Zystoskopie zu ermöglichen.

Hierzu werden im Einzelnen folgende Zielstellungen formuliert:

1. Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der mFISH-Urinuntersuchung einschließlich der Korrelation zur T-Kategorie (T) und zum Malignitätsgrad (G)
2. Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie einschließlich der Korrelation zur T-Kategorie (T) und zum Malignitätsgrad (G)
3. Vergleich der Ergebnisse der Urinzytologie mit der mFISH-Urinuntersuchung
4. Bestimmung der Sensitivität und Spezifität bei einem kombinierten Einsatz der mFISH-Urinuntersuchung und der Urinzytologie in Korrelation zur T-Kategorie (T) und zum Malignitätsgrad (G)
5. Ermittlung der Sensitivität der mFISH-Untersuchung am Tumormaterial mit Korrelation zur T-Kategorie (T) und Malignitätsgrad (G)
6. Vergleich der mFISH-Befunde aus dem Urin mit den Tumormaterialbefunden und Korrelation zur T-Kategorie (T) und Malignitätsgrad (G)
7. Retrospektive Analyse des klinischen Verlaufs bei Patienten mit auffälligem mFISH-Befund bei fehlendem histologischen Tumornachweis in der Harnblase.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Für die vorliegende Studie wurde Material von 131 Patienten der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena verwendet, bei denen zystoskopisch der Verdacht auf einen Harnblasentumor bestand und anschließend eine transurethrale Resektion dieses Befundes erfolgte. In diesem Kollektiv war die Mehrzahl der Patienten männlichen Geschlechts (männlich: 92 (70,2 %), weiblich: 39 (29,8 %)). Die Patienten waren zwischen 21 und 92 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 69,5 Jahre (SD 11,4). 7 Patienten flossen aufgrund eines Rezidivtumors zweimal und 3 Patienten aus demselben Grund dreimal in die Untersuchungen ein, so dass insgesamt 144 Fälle untersucht wurden.

Ein Großteil der histologisch gesicherten Tumorbefunde waren gut differenzierte nichtinvasive Urothelkarzinome. Bei 31 Präparaten ließ sich histologisch kein maligner Tumor nachweisen. Die genaue Verteilung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verteilung der histologischen Befunde (gesamtes Kollektiv)

| T Kategorie | n | % | Grading | n | % |
|--------------------|----------|----------|--------------------|----------|----------|
| kein Tumornachweis | 31 | 21,5 | kein Tumornachweis | 31 | 21,5 |
| pTcis | 1 | 0,7 | G1 | 70 | 48,6 |
| pTa | 78 | 54,2 | G2 | 31 | 21,5 |
| pT1 | 24 | 16,7 | G3 + cis | 12 | 8,3 |
| pT2a | 8 | 5,6 | | | |
| pT2b | 0 | 0,0 | | | |
| pT3a | 1 | 0,7 | | | |
| pT3b | 1 | 0,7 | | | |

Anhand der 144 vor der transurethralen Tumorresektion gewonnenen Urinprobenproben dieser 131 Patienten erfolgte vergleichend zur Histologie und Urinzytologie eine mFISH-Untersuchung mit dem UroVysion Testkit (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA).

Bei 73 der untersuchten Fälle erfolgte bei 70 Patienten parallel die mFISH-Untersuchung von aufbereiteten Tumorzellen aus dem bei der transurethralen Tumorresektion gewonnenem Material. Auch in diesem Kollektiv war die Mehrzahl der Patienten männlichen Geschlechts (männlich: 54 (77,1 %), weiblich: 16 (22,9 %)). Das Patientenalter betrug im Durchschnitt 69,9 Jahre (28 bis 89 Jahre, SD

11,5). Bei 3 Patienten erfolgten aufgrund eines Rezidivbefundes zwei Untersuchungen. Die Verteilung der einzelnen Tumorbefunde ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Histologische Befunde in der Untergruppe des parallel untersuchten Tumorgewebes

| T Kategorie | n | % | Grading | n | % |
|--------------------|----------|----------|----------------|----------|----------|
| pTcis | 0 | | G1 | 48 | 65,8 |
| pTa | 51 | 69,9 | G2 | 16 | 21,9 |
| pT1 | 13 | 17,8 | G3 | 9 | 12,3 |
| pT2a | 7 | 9,6 | | | |
| pT2b | 0 | | | | |
| pT3a | 1 | 1,4 | | | |
| pT3b | 1 | 1,4 | | | |

3.2. Material (Urin / Tumorgewebe)

Die für die Urinuntersuchungen verwendeten Proben wurden als Spontanurin präoperativ (am Morgen des Operationstages) gewonnen und umgehend der Präparation zugeführt.

Die Gewebeproben der Tumoren stammen aus der Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena (UKJ), welche im Rahmen der oben erwähnten Eingriffe nach schriftlicher Einverständniserklärung des Patienten entnommen wurden.

3.3. Methoden

3.3.1. Urinzytologie

Anhand der präoperativ gewonnenen formalinfixierten Urinproben erfolgte bei allen 144 Fällen eine Urinzytologie im Institut für Pathologie des UKJ.

Für die Wertung wurden die verbalen Befundbeurteilungen in drei Gruppen unterteilt:

- Zytologie „positiv“ und „verdächtig“ – Zytologie tumorverdächtig
- Zytologie „negativ“ und „zweifelhaft“ – Zytologie nicht tumorverdächtig
- Zytologie nicht auswertbar.

3.3.2. Präparation der Zellkerne

Die präoperativ gewonnenen **Urinproben** wurden zunächst auf fünf 10-ml-Röhrchen verteilt und 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und dem Präparat 6 ml KCl pro 15 ml hinzugefügt. Nach dem Mischen wurden die Proben bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert und anschließend 1 ml Fixationslösung (Methanol-Eisessig 3:1, 4 °C) zugegeben. Im Weiteren erfolgte eine nochmalige Zentrifugation der Probe bei 900 U/min über 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment erneut mit der Fixationslösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit der Pipette entfernt. Dieser Waschschrift ist dreimal wiederholt worden, abschließend wurde das Sediment bei - 20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Für die Präparation der **Tumorgewebeproben** wurden von den in der Tumorbank in Form von Gefrierblöcken asservierten Proben 10 Schnitte mit einer Dicke von 20 µm angefertigt. Davon gelangten der erste, der fünfte und der zehnte Schnitt auf einen gesonderten Objektträger zur mikroskopischen Überprüfung des tatsächlichen Tumoranteils in der Probe.

Nach dem Auftauen der Schnitte wurden mit einer Lanzette die Gewebeanteile vom Tissue Tek isoliert, zerkleinert und in 300 µl PT-100 Puffer gegeben. Dabei wurde das Gewebe-Puffer-Gemisch mehrmals mit der Pipette aufgesaugt, um eine weitere Separation der Zellen zu erreichen und dann bei Raumtemperatur 90 Minuten in einem verschlossenen Tube inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei Raumtemperatur mit 6000 U/min zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dem verbleibenden Sediment wurden 500 µl einer frisch hergestellten Fixationslösung (Methanol-Eisessig 3:1, 4 °C) beigefügt. Nach dem Vermischen erfolgte eine nochmalige Zentrifugation bei 6000 U/min für zwei Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe von 200 – 500 µl Methanol-Eisessig (3:1, 4 °C) erfolgte das Auftropfen der Suspension auf einen Objektträger und nach dem Lufttrocknen die Beurteilung der erreichten Zelldichte unter dem Lichtmikroskop bei zwanzigfacher Vergrößerung. Areale, die sich aufgrund der erreichten Zelldichte und Zellseparation für die Auswertung nach erfolgter Hybridisierung eigneten, wurden auf der Unterseite des Objektträgers mit einer Diamantnadel markiert. Abschließend erfolgte die Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 85 % und 100 % je 1 Minute).

3.3.3. FISH

Die **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)** ist ein weltweit angewandtes und etabliertes Verfahren mit dem Chromosomen, Chromosomenabschnitte sowie auch einzelne Gene markiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden können.

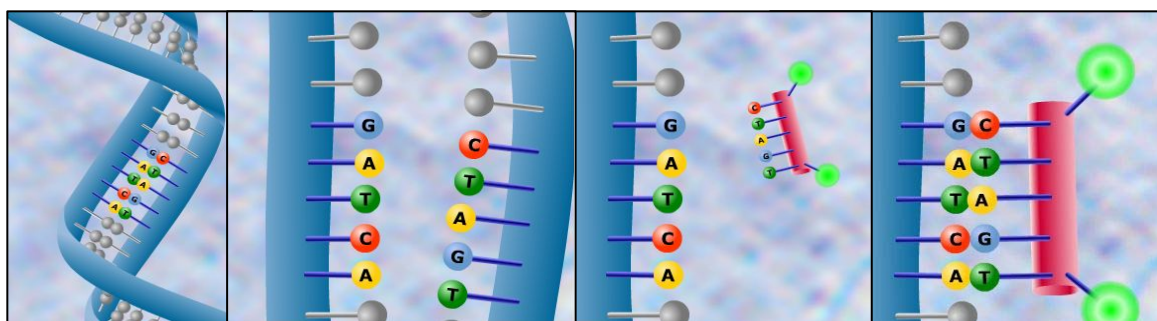
Ausgenutzt wird dabei die Fähigkeit einzelsträngiger Nukleinsäuren, sich mit Strängen komplementärer Basensequenzen zu doppelsträngigen Abschnitten zusammenzulagern.

Für die komplementäre Bindung mit den verwendeten DNA-Sonden, welche den zu markierenden Chromosomenabschnitten entsprechen, ist die Denaturierung der Doppelstrang-DNA (die beiden Stränge der Doppelstrang-DNA werden durch Hitze oder chemische Behandlung dissoziiert) notwendig. Anschließend können sich die Sonden anlagern (Renaturierung; Komplementäre DNA-Sequenzen der Sonde und des zu untersuchenden Zellkerns binden spezifisch aneinander). Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet.

Die DNA-Sonde ist direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert. Dadurch können die korrespondierenden Chromosomenstrukturen als fluoreszierende Signale mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht werden.

Es können je nach verwendeter Sonde (entsprechend der verwendeten DNA-Sequenz) somit beliebige bekannte DNA Abschnitte markiert und damit nachgewiesen werden. (Abbildung 3)

Abbildung 3: Prinzip der FISH; v. l. n. r.: Doppelstrang DNA, Dissoziation der Einzelstränge, Zugabe der markierten Sonde, Anlagerung der markierten komplementären Sonden-DNA an den Einzelstrang; modifiziert nach VYSIS UroVysion „Molekulare Zytologie zur Erkennung des Harnblasenkarzinoms“ (CD-ROM)



Der in dieser Arbeit verwendete Test (UroVysion von Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA) besteht aus einer Mischung von vier Sonden. Diese sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen („multicolor FISH“; mFISH) markiert. Die verwendeten DNA-Sequenzen sind homolog zu spezifischen Regionen der Chromosomen 3, 7, 9, und 17 (Tabelle 8). Zusätzlich ist dem Sondenmix nicht markierte „Blockierungs-DNA“ beigefügt, um Sequenzen in den Zielloci zu unterdrücken, die auch in anderen Chromosomen enthalten sind.

Tabelle 8: Verwendete DNA-Sonden (UroVysion, Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA); CEP® - Chromosom Enumerations-Sonde, LSI® - Locus spezifische Identifikationssonde

| verwendete Sonden | Chromosom / Genlocus | Markierung |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------|
| CEP® 3 | Chromosom 3 | SpectrumRed® |
| CEP® 7 | Chromosom 7 | SpectrumGreen® |
| CEP® 17 | Chromosom 17 | SpectrumAqua® |
| LSI® 9p21 | Genlocus 9p21 | SpectrumGold® |

Für die Hybridisierung der zuvor präparierten und objektträgerfixierten Urin- und Tumorzellproben mit den DNA-Sonden erfolgte das weitere Vorgehen in Anlehnung an die Gebrauchsvorschriften des Herstellers. Angaben zu den verwendeten Reagenzien finden sich in Tabelle 9. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden erläutert.

Tabelle 9: Verwendete Reagenzien und Materialien

| | |
|--|--|
| 1 x PBS (Abkürzung engl.: Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung) | Pufferlösung mit Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat |
| 2 x SSC (Standard Saline Citrate Lösung) | 100 ml 20 x SSC (Natriumchlorid- und Natriumcitratlösung), 900 ml Aqua dest pH Wert auf 7,0 mit 1N HCl einstellen |
| 4 x SSC / Tween | 100 ml 20 x SSC, 400 ml Aqua dest, 500 µl Tween 20® (Polysorbate 20) pH Wert auf 7,0 mit 1N HCl einstellen |
| 70 % Formamid / 2 x SSC (Formamid-SSC-Lösung) | 70 ml Formamid, 10 ml 20 x SSC, 20 ml Aqua bidest pH Wert auf 7,0 mit 1N HCl einstellen |

| | |
|---|--|
| DAPI – Antifade VECTASHIELD® with DAPI (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA) | DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindol) Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung der DNA, Ausbleichen durch „Antifading-Mittel“ (fading – engl.: Ausbleichen) verzögert |
| Fixogum® (Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland) | Klarer, dickflüssiger Montagekleber auf Naturkautschukbasis mit organischen Lösungsmitteln |
| KCl Lösung | Kaliumchloridlösung 5,59 g/l |
| Postfixationslösung (1 % Formaldehyd in 1 x PBS + 50 mM MgCl ₂) | 60 µl 37 % Methanal, 2 ml 1 x PBS, 100 µl 1N MgCl ₂ |
| Methanol-Eisessig 3:1 (Fixationslösung) | Frisch zubereitete Fixationslösung aus Methanol und Essigsäure (Eisessig), hier Verwendung bei 4 °C |
| Pepsinlösung (0,1 %) | Pepsinstammlösung (eingefroren, 50 mg Pepsin in 500 µl sterilem Aqua dest), 99 ml Aqua dest, 1 ml 1N HCl) |
| PT-100 Puffer | 0.1 M Citrat Puffer (19,2 g Zitronensäure, 1000 ml Aqua dest), 0,05% Tween |

Vorbereitung der Präparate

Zunächst wurde das nach der Dehydrierung (siehe 3.3.2. Präparation der Zellkerne) verbliebene überschüssige Ethanol von den Objektträgern entfernt, anschließend 100 µl Postfixationslösung auf diesen aufgetragen, mit einem „Coverslip“ abgedeckt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt folgte das Vorwärmen der Präparate für 2 Minuten in 2 x SSC Lösung bei 37 °C. Anschließend wurden die Proteine der Zellkerne in einer Pepsinlösung bei 37 °C 10 Minuten „angedaut“, um ein besseres Eindringen der Sonden zu ermöglichen. Diesem Schritte folgte ein fünfminütiger Waschvorgang in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf einem Rütteltisch und eine erneute Nachbehandlung mit Postfixationslösung (100 µl) wie oben beschrieben. Die Vorbereitungen wurden mit einer Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 85 % und 100 % je 1 Minute) abgeschlossen und die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet.

Da die **Denaturierung der DNA** der Sonden und der Präparate für ein optimales Hybridisierungsergebnis zeitlich aufeinander abgestimmt sein mussten, erfolgte eine exakte Planung des Ablaufs der folgenden Arbeitsschritte.

Die benötigte Menge des Sondenmixes (UroVysion) (2 µl pro 12 mm kreisförmigem Hybridisierungsbereich) wurden in einen Tube gegeben und die Sondenmix-DNA bei 73 °C in einem Wasserbad denaturiert.

Parallel erfolgte die Denaturierung der DNA der Zellkerne auf den Objektträgern über 2 Minuten bei 73 °C in einer Formamid-SSC-Lösung (70 % Formamid / 2 x SSC). Anschließend wurde eine Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 85 %, 100 % je 1 Minute) durchgeführt und nach dem Trocknen der Präparate der Sondenmix (2 µl) auf die zuvor markierten Hybridisierungsbereiche aufgetragen, mit einem 12 mm Runddeckglas abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet.

Die Präparate wurden in einer feuchteten Kammer (luftdichter Behälter mit angefeuchtetem Löschpapier ausgeschlagen) bei 37 °C über Nacht (etwa 16 Stunden) zur **Hybridisierung** in einen Brutschrank gegeben.

Nach der Entnahme aus dem Brutschrank, dem Entfernen der Gummilösungsdichtung und des Deckglases wurde mit den **Post-Hybridisierungs-Waschschritten** fortgefahren. Dies erfolgte zunächst 10 Minuten in 50 %iger Formamidlösung (bei 42 °C), anschließend 10 Minuten in 2 x SSC Lösung (bei 42 °C) und abschließend 2 Minuten in 4 x SSC / Tween (bei Raumtemperatur).

Im letzten Schritt wurden 20 µl DAPI-Antifade zur Färbung der Zellkerne auf den Hybridisierungsbereich aufgetragen und der Objektträger mit einem 24 x 60 mm Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Diese Präparate wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung lichtgeschützt im Kühlschrank für maximal 48 Stunden aufbewahrt.

3.3.4. Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopische Auswertung wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Jena – Göttingen – München, Deutschland) mit einer 100 W Quecksilberdampflampe als Anregungslichtquelle und einem Sonden- und DAPI-spezifischen Filtersystem verwendet. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer CCD-Kamera (IMAC-CCD S30, COMPULOG Computer Systeme GmbH, Böblingen, Deutschland) aufgenommen und mit einem digitalen Bildanalyseprogramm (ISIS® -

In Situ Imaging System, Metasystems, Altlußheim, Deutschland) ausgewertet und archiviert.

Dabei erfolgte unter Verwendung des Filtersystems die Auszählung der Signale für die Chromosomen 3, 7, 17 und für 9p21 bei mindestens 25 (Urin) bzw. 50 Zellkernen (Gewebe) mit auffälliger Morphologie (großer Zellkern, unregelmäßiger Umriss, unregelmäßige DAPI-Färbung). Hierzu wurden die markierten Präparatebereiche mäanderförmig, unter Vermeidung einer doppelten Auszählung von Zellkernen, abgesucht.

Abbildung 4 zeigt eine Falschfarbendarstellung eines „unauffälligen“ Zellkerns.

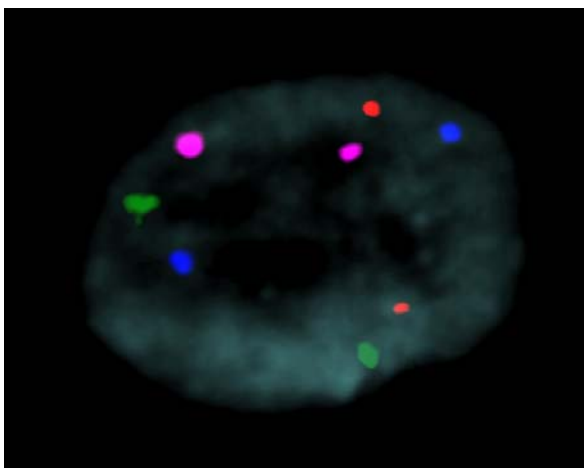


Abbildung 4: Falschfarbendarstellung eines Zellkerns mit unauffälligem mFISH-Befund mit jeweils zwei Signalen für jede Sonde zusammengesetzt aus den Einzelaufnahmen mit den verschiedenen Farbfiltern, Hintergrund: Grau (DAPI-Färbung des Chromatins im Zellkern), Einzelsignale: Magenta (CEP für Chromosom 3) , Blau (CEP für Chromosom 17), Grün (CEP für Chromosom 7), Rot (LSI für Genlocus 9p21)

Einteilung der Zellen mit nachweisbaren Veränderungen

Die fluoreszenzmikroskopisch ausgewerteten Zellkerne wurden entsprechend der nachweisbaren Veränderungen in verschiedene Kategorien (a, b und c) eingeteilt. Die ursprüngliche Empfehlung des Herstellers für Urinproben wurde bewusst erweitert, um eine Vergleichbarkeit zu dem untersuchten Tumorgewebe zu ermöglichen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Einteilung der untersuchten Zellkerne entsprechend der nachweisbaren Veränderungen

| Kategorie | Veränderung |
|-----------|---|
| a | Polysomie bei mindestens 2 der Chromosomen 3, 7 oder 17 |
| b | Polysomie bei einem der Chromosomen 3, 7 oder 17 |
| c | homozygote Deletion 9p21 |

Interpretation der Befunde

Entsprechend den Anwendungsvorschriften zum Vysis UroVysion Testkit und den Interpretationsvorschriften des Herstellers (Vysis Inc. 2002) wurden die analysierten Urinproben als positiv gewertet, wenn bei 25 ausgewerteten Zellkernen mit atypischer Morphologie (großer Zellkern, unregelmäßiger Umriss, unregelmäßige DAPI-Färbung) vier oder mehr Zellkerne mit einer Polysomie bei mindestens 2 der Chromosomen 3, 7 oder 17, zehn mit einer Polysomie bei mindestens einem Chromosom (3, 7 oder 17) oder zehn Zellkerne mit einem homozygoten Verlust 9p21 gefunden wurden. Um eine erweiterte Aussagekraft bezüglich der Ergebnisse der mFISH zu ermöglichen, wurde eine weitere Grenzwertkategorie („erweiterte Grenzwerte“) definiert, bei der entweder 10 % der Zellen Veränderungen der Kategorie a oder 20 % der Zellen Veränderungen entsprechend Kategorie b oder c aufweisen müssen (Tabelle 10). Abbildung 5 zeigt Falschfarbendarstellungen von Zellkernen mit verschiedenen Veränderungen.

Für die Befundinterpretation der präparierten Zellkerne aus dem Tumorgewebe erfolgte ebenfalls dieselbe differenzierte Betrachtung wie oben beschrieben. Für einen als positiv gewerteten Test wurden die Grenzwerte für Veränderungen im Tumorgewebe, basierend auf den Untersuchungen von Schwarz et al. (2004), verwendet.

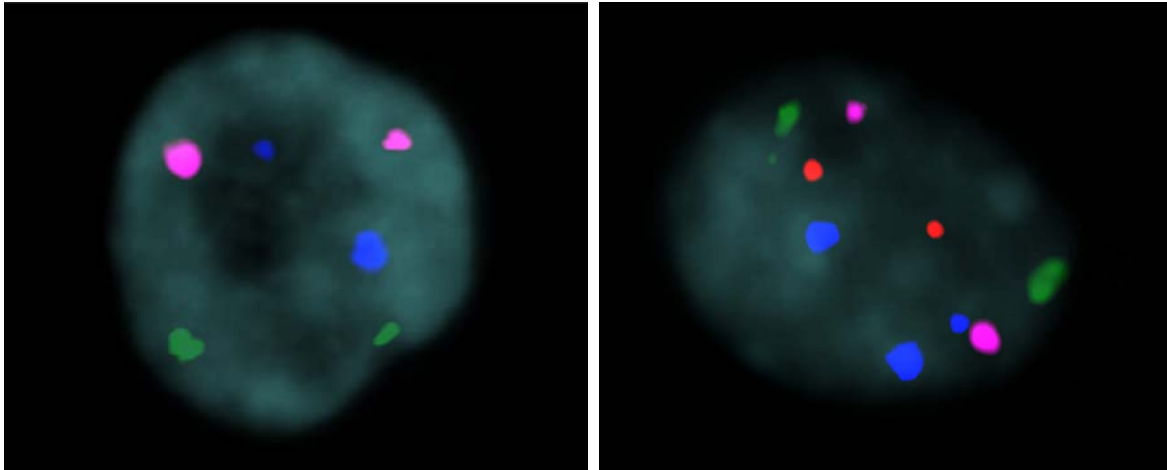
Eine Übersicht über die Befundinterpretation ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Befundinterpretation der mFISH entsprechend der Zellkernkategorien wie in Tabelle 10 definiert; ¹⁾ die Grenze von 4 bzw. 10 Zellen wird laut Hersteller als unsicher angegeben, sicher als positiv zu bewerten sind 20 bzw. 40 %; ²⁾ zur Modifikation der Auswertung wurden zusätzlich alternative Grenzwerte definiert

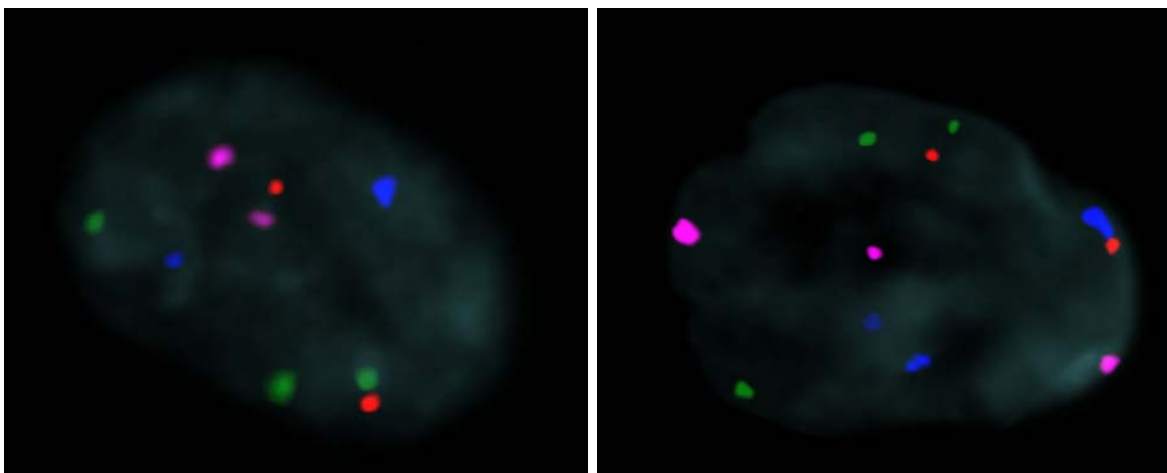
| Zellkern- kategorie | Grenzwert für als positiv gewertete mFISH-Befunde | | | |
|------------------------|---|------|--|------------------------|
| | Urin | | Tumorgewebe | |
| | nach Vysis UroVysion | | erweiterte Grenzwerte ²⁾ | nach Schwarz et al. |
| a | $\geq 4 / 25^{1)}$ | 20 % | 10 % | Summe a und b 18 % |
| b | $\geq 10 / 25^{1)}$ | 40 % | 20 % | |
| c | $\geq 10 / 25^{1)}$ | 40 % | 20 % | 14 % |

Abbildung 5: Falschfarbenbilder von Zellkernen mit einem auffälligem mFISH-Befund, zusammengesetzt aus den Einzelaufnahmen mit den verschiedenen Farbfiltern, Hintergrund: Grau (DAPI-Färbung des Chromatins im Zellkern), Einzelsignale: Magenta (CEP für Chromosom 3), Blau (CEP für Chromosom 17), Grün (CEP für Chromosom 7), Rot (LSI für Genlocus 9p21)

links: homozygoter Verlust von 9p21, rechts: einfacher Zugewinn Chromosom 17



links: einfacher Zugewinn Chromosom 7, rechts: Zugewinne bei Chromosom 3, 7 und 17



3.3.5. Datenerfassung und Auswertung

Für die Auswertung, den Vergleich, die abschließende Dokumentation und die graphische Darstellung der Befunde wurden die erhobenen Daten mit Microsoft Excel (Version 97 – 2003 und 2007 im Kompatibilitätsmodus) aufgenommen.

Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität erfolgte nach den allgemein angewandten Formeln:

Sensitivität = (Anzahl richtig positiv) / (Anzahl richtig positiv + Anzahl falsch negativ)

Spezifität = (Anzahl richtig negativ) / (Anzahl richtig negativ + Anzahl falsch positiv).

4. Ergebnisse

4.1. mFISH-Untersuchung des Urins (gesamtes Kollektiv)

Unter Beachtung der Herstellerkriterien zur Auswertung (siehe Tabelle 11) konnten anhand der mFISH-Untersuchung des Urins mit dem UroVysion Testkit 49 (43,4 %) der insgesamt 113 histologisch bestätigten Urothelkarzinome nachgewiesen werden. Bei 22 (71 %) der 31 Fälle ohne Karzinomnachweis im Präparat der transurethralen Resektion war die mFISH negativ. 18 Urinproben (12,5 %) konnten aufgrund einer zu geringen Zellzahl im Urin nicht ausgewertet werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnisse der mFISH im gesamten Kollektiv

| Histologie | mFISH negativ | | mFISH positiv | | mFISH nicht auswertbar | | Summe | |
|------------|---------------|-------|---------------|-------|------------------------|-------|-------|-----|
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| kein Tumor | 22 | 70,97 | 5 | 16,13 | 4 | 12,90 | 31 | 100 |
| Tumor | 50 | 44,25 | 49 | 43,36 | 14 | 12,39 | 113 | 100 |

Ohne Berücksichtigung der nicht auswertbaren Befunde ließen sich für diesen Test eine Sensitivität von 49,5 % und eine Spezifität von 81,5 % über alle Tumorkategorien ermitteln.

Durch eine Veränderung der Grenzwerte (siehe Tabelle 11) erhöhte sich die Sensitivität auf 60,6 % und die Spezifität verringerte sich auf 74,1 % (Tabelle 13).

Tabelle 13: Sensitivität und Spezifität der mFISH nach „erweiterten Grenzwerten“

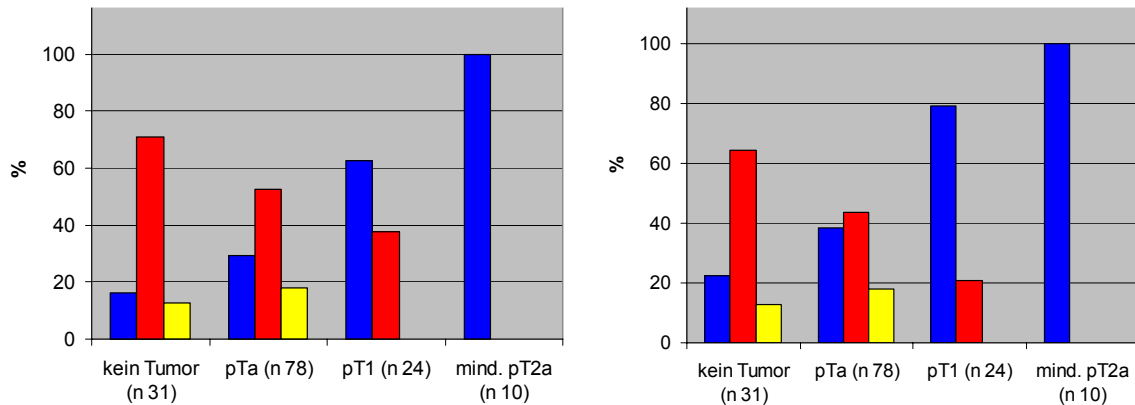
| | Histologie | mFISH negativ | | mFISH positiv | | mFISH nicht auswertbar | | Sensitivität | Spezifität |
|-----------------------|------------|---------------|-------|---------------|-------|------------------------|-------|--------------|------------|
| | | n | % | n | % | n | % | | |
| erweiterte Grenzwerte | kein Tumor | 20 | 64,52 | 7 | 22,58 | 4 | 12,90 | 60,6 % | 74,1 % |
| | Tumor | 39 | 34,51 | 60 | 53,10 | 14 | 12,39 | | |

Korrelation zu Tumorkategorie (T) und Malignitätsgrad (G)

Unterteilt nach der Ausdehnung des Primärtumors (T) ist zu erkennen, dass alle 10 muskelinvasiven Tumoren (\geq pT2a) durch die mFISH-Urinuntersuchung erkannt werden konnten. Von den 78 pTa-Tumoren konnten 23 (29,49 %) und von den 24 pT1-Tumoren 15 (62,5 %) bei Zugrundelegung der Herstellerkriterien detektiert werden. Anhand der erweiterten Grenzwerte ließen sich 30 (38,46 %, pTa) bzw. 19

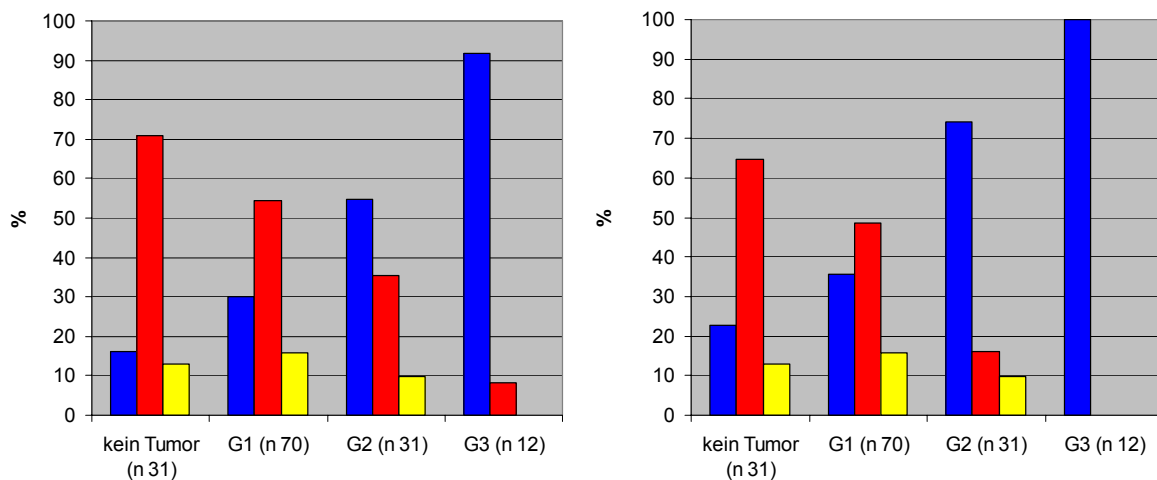
(79,17 %, pT1) dieser Tumoren erfassen (Abbildung 6). Die genaue Aufstellung findet sich in der Tabelle 25 im Anhang.

Abbildung 6: Ergebnis mFISH-Urinuntersuchung in Korrelation zur Ausdehnung des Primärtumors (T), links: entsprechend der Herstellergrenzwerte, rechts „erweiterte Grenzwerte“ (siehe Tabelle 11); blau: mFISH positiv, rot: mFISH negativ, gelb: mFISH nicht auswertbar



Ein ähnliches Bild fand sich in Korrelation zum Differenzierungsgrad. Es ließen sich 21 (30 %) der 70 G1-, 17 (54,84 %) der 31 G2- und 11 (91,67 %) der 12 G3-Tumoren anhand des mFISH-Urinbefundes bei einem Cutoff nach Herstellerkriterien finden (nach „erweiterten Grenzwerten“ 25 (35,71 %) G1-, 23 (74,19 %) G2- und 12 (100 %) der G3-Tumoren). (Abbildung 7 und Tabelle 26 im Anhang).

Abbildung 7: Ergebnis mFISH-Urinuntersuchung in Korrelation zum Differenzierungsgrad (G) des Tumors, links: entsprechend der Herstellergrenzwerte, rechts „erweiterte Grenzwerte“ (siehe Tabelle 11); blau: mFISH positiv, rot: mFISH negativ, gelb: mFISH nicht auswertbar



Somit ergab sich ohne Berücksichtigung der nicht auswertbaren Befunde eine Sensitivität der mFISH für die pTa-Tumoren von 35,9 %, für die pT1-Tumoren von 62,5 %, und für die muskelinvasiven Tumoren (\geq pT2a) von 100 % (nach „erweiterten Grenzwerten“ 46,9 %, 79,2 % und 100%). In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad ließ sich diese für G1-Tumoren mit 35,6 %, für G2 mit 60,7 % und für G3 Tumoren mit 91,7 % ermitteln (nach „erweiterten Grenzwerten“ 42,4 %, 82,1 % und 100 %). Die Übersicht der Ergebnisse aller untersuchten Fälle findet sich in Tabelle 31 im Anhang.

4.2. Urinzytologie (gesamtes Kollektiv)

Die Mehrzahl (59 %) der untersuchten Urinproben erbrachte einen unauffälligen zytologischen Befund („negativ“ oder „zweifelhaft“). Bei 40 Proben (34,7 %) wurde ein Tumorverdacht geäußert. 9 Proben (6,25 %) konnten nicht ausgewertet werden. Die genaue Verteilung findet sich in Tabelle 24 im Anhang.

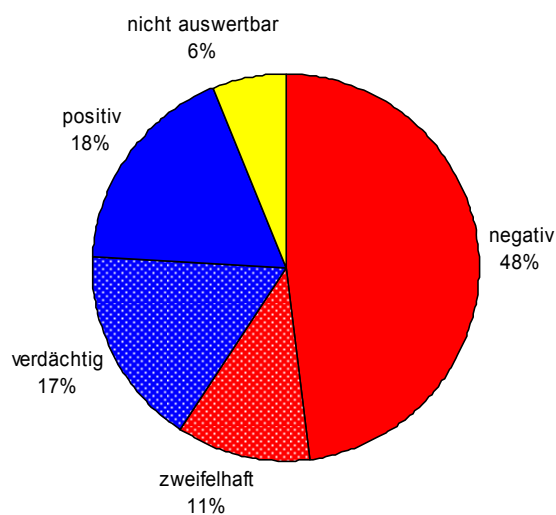


Abbildung 8: Ergebnisse der Urinzytologie des gesamten Kollektives

Bei 44 (38,9 %) der 113 histologisch gesicherten Tumoren fand sich eine tumorsuspekte Urinzytologie, bei 62 (54,9 %) war diese nicht tumorverdächtig und bei 7 (6,2 %) nicht auswertbar.

In der Gruppe ohne Tumornachweis (31 Fälle) fanden sich 6 (19,4 %) tumorverdächtige und 23 (74,2 %) nicht tumorverdächtige Zytologiebefunde. Bei 2 (6,5 %) Proben war die Zytologie nicht auswertbar.

Über alle Tumorkategorien ergab sich somit bei Außerachtlassung der nicht auswertbaren Zytologiebefunde in diesem Kollektiv eine Sensitivität von 41,5 %. Die ermittelte Spezifität betrug 79,3 %.

Korrelation zu Tumorkategorie (T) und Malignitätsgrad (G)

Tumorsuspekte Zytologiebefunde fanden sich bei 26 (33,3 %) der pTa-, 11 (45,8 %) der pT1- und 7 (87,5 %) der pT2a-Tumoren, sowie entsprechend des ermittelten Tumorgradings bei 20 (28,6 %) G1-, 18 (58,1 %) G2- und 6 (50 %) G3-Tumoren. Der eine Befund des Carcinoma in situ ließ sich in der Urinzytologie nicht nachweisen (Abbildung 9 und 10). Die genaue Gegenüberstellung findet sich in Tabelle 27 im Anhang.

Abbildung 9: Ergebnis Urinzytologie in Korrelation zur Tiefenausdehnung des Tumors; blau: Zytologie tumorverdächtig („positiv“ oder „verdächtig“), rot: Zytologie nicht tumorverdächtig („negativ“ oder „zweifelhaft“), gelb: Zytologie nicht auswertbar

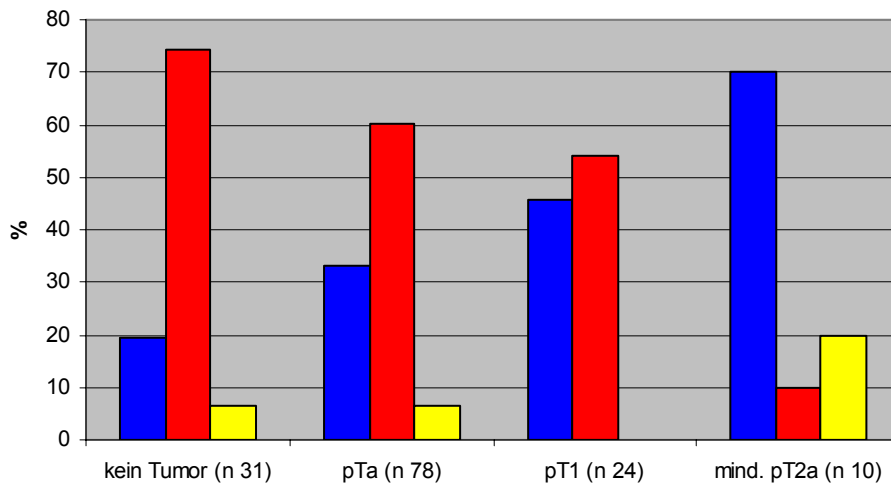
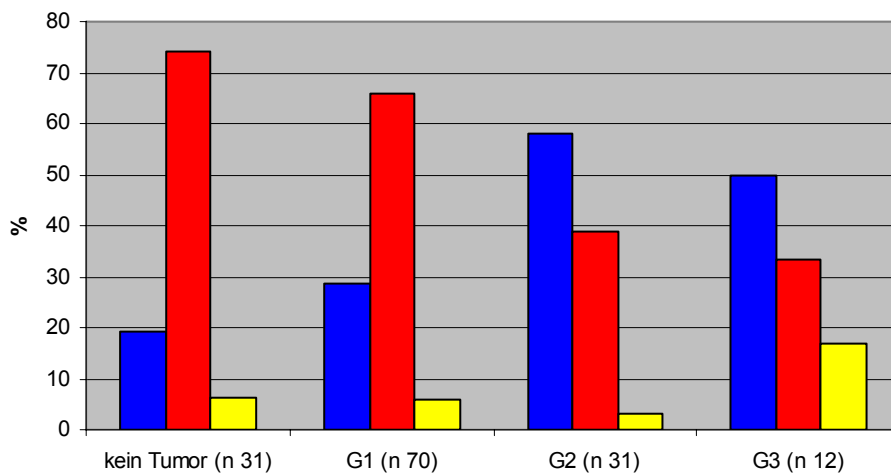


Abbildung 10: Ergebnis Urinzytologie in Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors; blau: Zytologie tumorverdächtig („positiv“ oder „verdächtig“), rot: Zytologie nicht tumorverdächtig („negativ“ oder „zweifelhaft“), gelb: Zytologie nicht auswertbar



Bei Außerachtlassung der nicht auswertbaren Befunde ergab sich somit eine Sensitivität der Urinzytologie für pTa- von 35,6 %, für pT1- von 45,8 % und für pT2a-Tumoren von 87,5 %, in Korrelation zum Grading für G1 von 30,3 %, G2 von 60 % und G3 von 60 %. Aufgrund der Sonderstellung wurde der eine Befund des Carcinoma in situ bei der Sensitivitätsberechnung in Korrelation zur Infiltrationstiefe des Tumors nicht berücksichtigt.

4.3. Gegenüberstellung Urinzytologie – mFISH-Untersuchung des Urins

Im Vergleich der Ergebnisse der Urinzytologie und der mFISH-Untersuchung des Urins konnte im Sinne eines Tumorverdachtes in 31 Fällen (21,53 %) eine Übereinstimmung erzielt werden, bei 51 Fällen (35,42 %) ließ sich mit keiner Methode ein Tumorverdacht aussprechen und konträre Ergebnisse fanden sich in 35 Fällen (24,31 %). Bei 27 (18,75 %) Fällen waren die Ergebnisse einer der beiden Methoden nicht auswertbar.

Korrelation zu Tumorkategorie (T) und Malignitätsgrad (G)

Im Vergleich zur Tiefeninfiltration fand sich bei 13 (16,7 %) der 78 **pTa-Tumoren** sowohl ein positiver mFISH als auch ein tumorverdächtiger Zytologiebefund. In 28 Fällen (35,9 %) ließ sich sowohl ein negativer mFISH als auch ein negativer Zytologiebefund ermitteln. Konträre Ergebnisse (mFISH positiv und Zytologie negativ sowie mFISH negativ und Zytologie positiv) fanden sich in jeweils 9 (11,5 %) Fällen. Bei 19 Proben (24,4 %) war eine der beiden Untersuchungen nicht auswertbar.

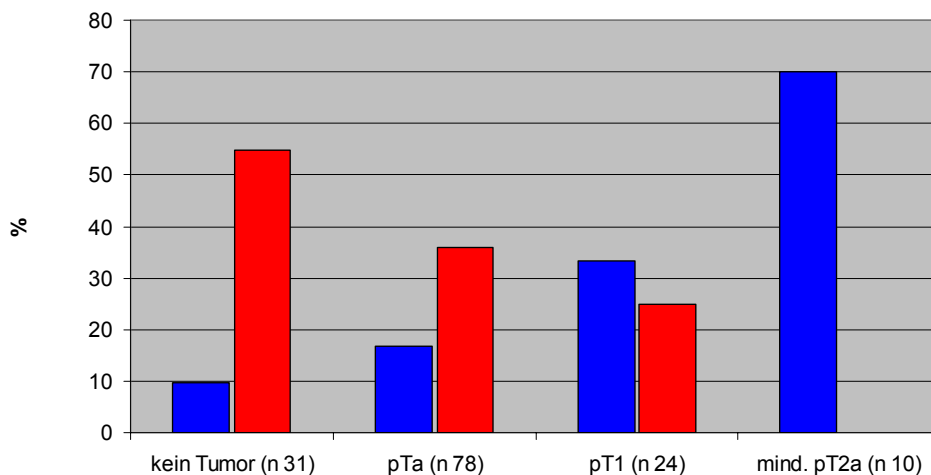
In der Gruppe der 24 **pT1-Tumoren** ließ sich eine Übereinstimmung von mFISH- und Zytologiebefund im Sinne eines positiven Resultates bei 8 (33,3 %) und mit negativem Befund bei 6 (25 %) ermitteln. Ein positiver mFISH- und ein negativer Zytologiebefund fand sich bei 7 (29,2 %) und die gegenteilige Konstellation bei 3 (12,5 %) dieser Fälle.

Bei den 8 **pT2a-Befunden** konnte ein übereinstimmender Tumorverdacht bei 7 (87,5 %) untersuchten Proben ermittelt werden. In einem Fall erbrachte die Zytologie einen negativen und die mFISH einen positiven Befund.

Die zytologische Untersuchung bei dem einen **pT3a-** und dem einen **pT3b-Befund** war nicht auswertbar. Bei dem einen Befund des **Carcinoma in situ** konnte ein positiver mFISH- und ein negativer Zytologiebefund erhoben werden.

Die Verteilung entsprechend der Tumordinfiltrationstiefe der gleichlautenden mFISH und Zytologiebefunde ist in Abbildung 11 zur Veranschaulichung dargestellt.

Abbildung 11: Gleichlautende mFISH- und Zytologiebefunde in Korrelation zur Infiltrationstiefe des Tumors (T); blau: mFISH und Zytologie positiv, rot: mFISH und Zytologie negativ



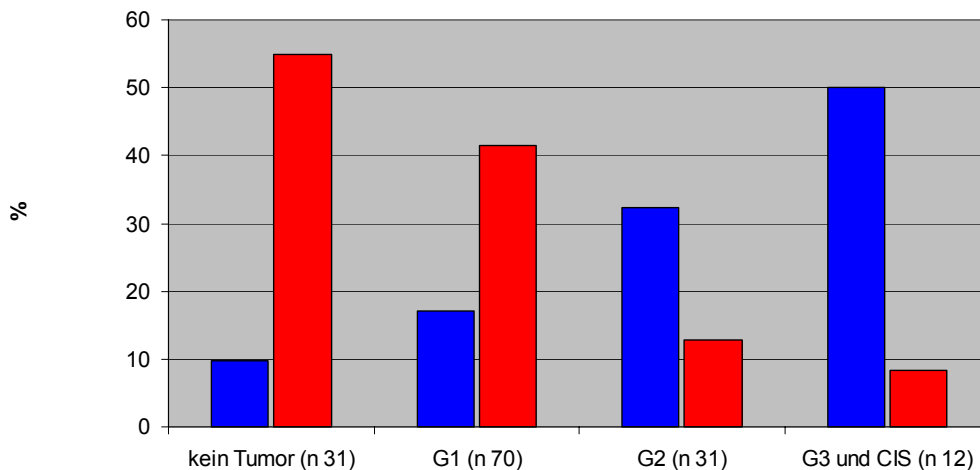
Aufgeschlüsselt nach dem Differenzierungsgrad ließ sich bei den 70 **G1-Tumoren** in 12 Fällen (17,1 %) sowohl ein positiver mFISH als auch ein positiver Zytologiebefund ermitteln. Bei 29 (41,4 %) Fällen ergaben sowohl die mFISH als auch die Zytologie einen negativen Befund. Bei 12,9 % (9 Fälle) fanden die Untersuchungen einen positiven mFISH- und einen negativen Zytologiebefund. In 5 Fällen (7,1 %) ergab sich eine gegenteilige Konstellation. Bei 15 Proben (21,4 %) konnte eine Untersuchung nicht ausgewertet werden.

In der Gruppe der 31 **G2-Tumoren** konnte bei 10 (32,3 %) ein positiver mFISH und Zytologiebefund festgestellt werden. In 4 Fällen (12,9 %) fielen beide Befunde negativ aus. Gegensätzliche Befunde (mFISH positiv und Zytologie negativ oder mFISH negativ und Zytologie positiv) fanden sich in 19,4 % (6) beziehungsweise 22,6 % (7) der Fälle. Bei 4 Proben (12,9 %) war eine der beiden Untersuchungen nicht auswertbar.

Übereinstimmende Ergebnisse der mFISH und Zytologie bei den 12 **G3-Tumoren** (einschließlich Carcinoma in situ) fanden sich bei positiven Befunden bei 6 (50 %) und bei negativen Befunden bei einem (8,3 %) untersuchten Fall. Ein positiver

mFISH- bei negativem Zytologiebefund war in 3 Fällen (25 %) zu verzeichnen. Bei 2 Untersuchungen (16,7 %) war die zytologische Untersuchung nicht auswertbar. Diese Verteilung entsprechend des Differenzierungsgrades der gleichlautenden mFISH und Zytologiebefunde ist in Abbildung 12 dargestellt.

Abbildung 12: Gleichlautende mFISH- und Zytologiebefunde in Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors (G); blau: mFISH und Zytologie positiv, rot: mFISH und Zytologie negativ



Eine tabellarische Übersicht der oben beschriebenen Verteilung findet sich im Anhang in Tabelle 28.

4.4. Kombination beider Methoden (Zytologie und mFISH)

Anhand der Verknüpfung beider Methoden (Zytologie und/oder mFISH-Untersuchung positiv) musste bei 73 (50,7 %) Fällen ein Tumorverdacht geäußert werden. Kein Tumoranhalt in Zytologie- und mFISH-Untersuchung ergab sich bei 71 (49,3 %) Proben. Befunde, bei denen sowohl die Urinzytologie als auch die mFISH nicht auswertbar waren, fanden sich nicht.

Im Vergleich mit dem histologischen Befund konnten 65 (57,5 %) der 113 histologisch bestätigten Harnblasentumoren im Urin nachgewiesen werden. Bei 23 der 31 untersuchten Proben ohne histologischen Tumornachweis konnte weder durch mFISH noch durch die Urinzytologie ein Tumorverdacht ausgesprochen werden.

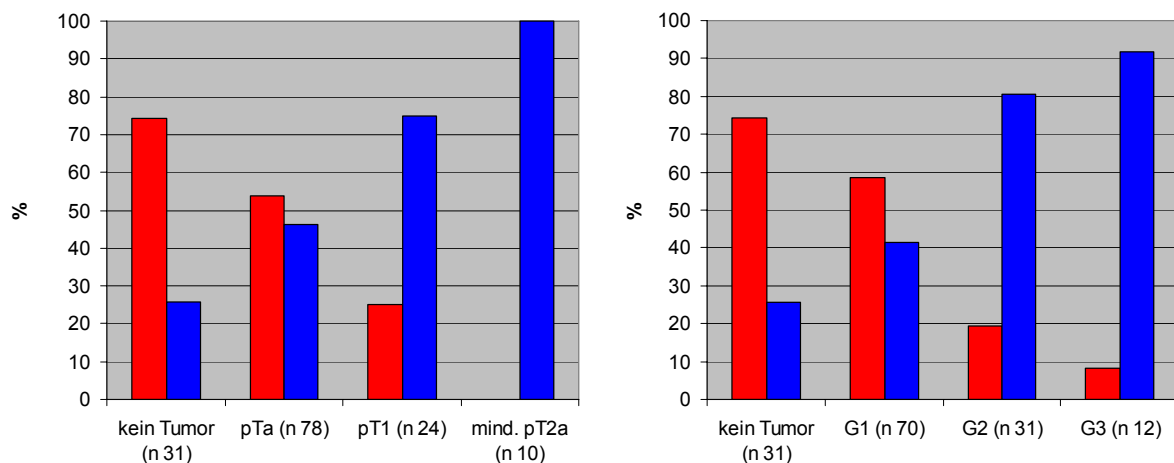
Es konnte somit eine Sensitivität der Kombination beider Untersuchungen über alle Tumorklassifikationen von 57,5 % und eine Spezifität von 74,2 % ermittelt werden.

Korrelation zu Tumorkategorie (T) und Malignitätsgrad (G)

Wie bereits allein durch die mFISH-Untersuchung waren alle muskelinvasiven Tumoren sowie der eine Fall des Carcinoma in situ im Urin nachweisbar. Von den 78 pTa-Tumoren konnten 36 und von den 24 pT1-Tumoren 18 detektiert werden. Bei gesonderter Betrachtung des Differenzierungsgrades ließen sich 29 der 70 G1-, 25 der 31 G2- und 11 der 12 G3-Tumoren nachweisen.

Damit ergab sich eine Sensitivität für pTa von 46,2 %, für pT1 von 75 %, für die muskelinvasiven Tumoren (\geq pT2a) von 100 %, für G1 von 41,4 %, für G2 von 80,7 % und für G3 von 91,7 % (Abbildung 13). Eine tabellarische Übersicht dieser Daten findet sich im Anhang in Tabelle 29.

Abbildung 13: Kombination der mFISH und der Urinzytologie in Korrelation zur Tiefenausdehnung (links) und zum Differenzierungsgrad (rechts) des Tumors; blau: Tumorverdacht (Zytologie „positiv“ oder „verdächtig“ oder mFISH positiv), rot: kein Tumorverdacht (Zytologie „negativ“ oder „zweifelhaft“ und mFISH negativ)



4.5. mFISH-Untersuchung des Urins (Untergruppe Urin / Tumormaterial)

In die Untergruppe der parallel untersuchten Urin- und Tumormaterialproben von 73 Fällen wurden ausschließlich Patienten mit einem histologischen Tumornachweis eingeschlossen. Bei 36 Fällen (49,3 %) erbrachte die mFISH-Untersuchung der Zellen aus dem Urin einen negativen Befund. Bei 8 Fällen (11%) war diese nicht auswertbar. Lediglich bei 29 (39,7 %) fanden sich nach den Herstellerkriterien ausreichend Zellen mit nachweisbaren Veränderungen im Urin, um einen positiven

mFISH-Befund zu erbringen. Die Aufteilung entsprechend der Histologie findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Ergebnisse der mFISH-Untersuchung der Urinproben (Untergruppe: Urin / Tumormaterial) gegliedert nach lokaler Tumorausbreitung und nach Tumorigradung

| Histologie | mFISH negativ | | mFISH positiv | | nicht auswertbar | | Summe |
|--------------|---------------|-------|---------------|-------|------------------|-------|-------|
| | n | % | n | % | n | % | |
| pTa | 29 | 56,86 | 14 | 27,45 | 8 | 15,69 | 51 |
| pT1 | 7 | 53,85 | 6 | 46,15 | 0 | 0 | 13 |
| pT2a | 0 | 0 | 7 | 100 | 0 | 0 | 7 |
| pT3a | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| pT3b | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| <hr/> | | | | | | | |
| G1 | 27 | 56,25 | 14 | 29,17 | 7 | 14,58 | 48 |
| G2 | 8 | 50 | 7 | 43,75 | 1 | 6,25 | 16 |
| G3 | 1 | 11,11 | 8 | 88,89 | 0 | 0 | 9 |
| <hr/> | | | | | | | |
| Summe | 36 | 49,32 | 29 | 39,73 | 8 | 10,96 | 73 |

Somit ergab sich in der Untergruppe dieser 73 Fälle eine Sensitivität von 39,7 % über alle Tumorkategorien. Im Einzelnen war für pTa-Tumoren eine Sensitivität von 32,6 %, für pT1 von 46,2 %, für \geq pT2a 100 %, für G1 34,1 %, für G2 46,7 % und für G3 88,9 % zu ermitteln.

4.6. mFISH-Untersuchung des Tumormaterials (Untergruppe Urin / Tumormaterial)

Im aufgearbeiteten Tumormaterial war bei 54 der 73 Proben ein positiver mFISH-Befund zu verzeichnen. Bei 19 Proben war der Test negativ. Es fanden sich keine nicht auswertbaren Befunde.

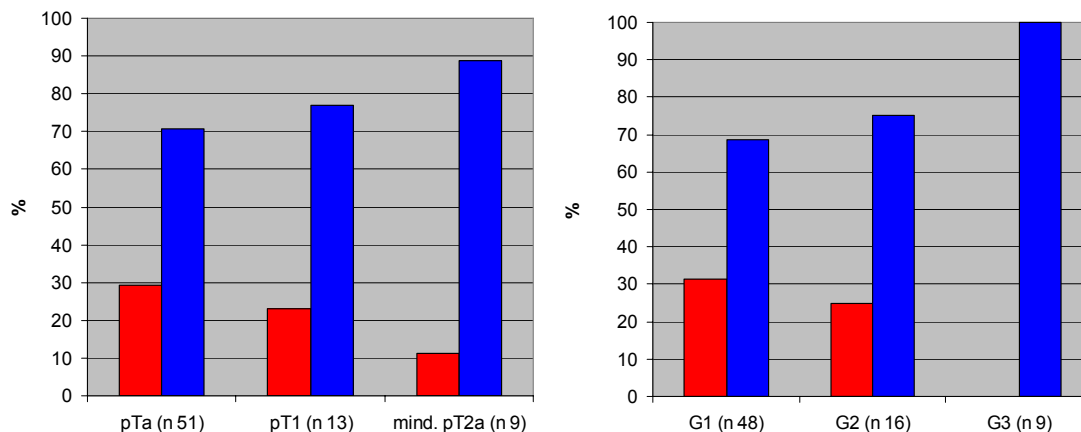
Somit konnte für die mFISH-Untersuchung des Tumormaterials eine Sensitivität über alle Tumorkategorien von 74 % ermittelt werden.

Korrelation zu Tumorkategorie (T) und Malignitätsgrad (G)

Anhand der Tumormaterialproben ließen sich 36 der 51 pTa-, 10 der 13 pT1-, 6 der 7 pT2a-Tumoren sowie die pT3a- und pT3b-Tumoren nachweisen. Die m-FISH-Untersuchung des Tumormaterials erbrachte bei 33 der 48 der G1, 12 der 16 G2- und bei allen 9 G3-Tumoren einen positiven Befund.

Damit ergab sich eine Sensitivität im Tumormaterial für pTa-Tumoren von 70,6 %, für pT1 von 76,9 %, für pT2a von 85,7 % und für pT3a und b von 100 %. Im Vergleich zum Differenzierungsgrad wurde diese für die G1-Tumoren mit 68,8 %, für die G2-Tumoren mit 75 % und für die G3-Tumoren mit 100 % ermittelt (Abbildung 14). Eine tabellarische Übersicht findet sich in Tabelle 30 im Anhang.

Abbildung 14: mFISH des Tumormaterials in Korrelation zur Tiefenausdehnung (links) und zum Differenzierungsgrad (rechts) des Tumors; blau: mFISH positiv, rot: mFISH negativ



4.7. mFISH des Tumormaterials im Vergleich zur mFISH des Urins und zur Zytologie

Durch die Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse der mFISH-Untersuchung von Zellen aus dem Urin und von Tumorzellen aus den Operationspräparaten ergaben sich bei Nichtbeachtung der 8 nicht auswertbaren mFISH-Untersuchungen des Urins vier verschiedene Konstellationen:

- 24 Fälle mit mFISH der Urinprobe und des Tumormaterials positiv
- 11 Fälle mFISH der Urinprobe und des Tumormaterials negativ
- 25 Fälle mFISH der Urinprobe negativ und des Tumormaterials positiv
- 5 Fälle mFISH der Urinprobe positiv und des Tumormaterials negativ

Diese sind in Tabelle 15 dargestellt.

In Tabelle 32 im Anhang werden alle Ergebnisse dieser Gruppe aufgeführt.

Tabelle 15: Vergleich der mFISH-Untersuchungen aus Urin und Tumormaterial; *Differenz zu 100 % resultiert aus 8 nicht auswertbaren mFISH-Urinuntersuchungen

| | mFISH Urin positiv | mFISH Urin negativ |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| mFISH Tumormaterial positiv | 24 (32,9 %*) | 25 (34,2 %*) |
| mFISH Tumormaterial negativ | 5 (6,8 %*) | 11 (15,1 %*) |

Korrelation zu Tumorkategorie (T), Malignitätsgrad (G) und zum zytologischen Befund

In den vier verschiedenen Konstellationsgruppen fanden sich im Einzelnen folgende Verteilung der Befunde hinsichtlich der Tumorkategorie, des Differenzierungsgrades und der zugehörigen Urinzytologie:

mFISH der Urinprobe und des Tumormaterials positiv

In dieser Gruppe fanden sich 12 (50 %) pTa-, 4 (16,7 %) pT1-, 6 (25 %) pT2a- und jeweils ein pT3a- und pT3b-Tumor. 11 (45,8 %) Befunde waren G1-, 5 (20,8 %) G2- und 8 (33,3 %) G3-Tumoren.

Von Seiten der zytologischen Befunde waren hier 17 (70,8 %) tumorverdächtige („positiv“ und „verdächtig“), 4 (16,7 %) nicht tumorverdächtige („negativ“ und „zweifelhaft“) und 3 (12,5 %) nicht auswertbare Fälle anzutreffen.

mFISH der Urinprobe und des Tumormaterials negativ

Hier waren 10 (90,9 %) pTa-, 1 (9,1 %) pT1-, 10 (90,9 %) G1- und 1 (9,1 %) G2-Befunde zu verzeichnen. Die Zytologie erbrachte bei 10 (90,9 %) Fällen einen nicht tumorverdächtigen und in einem Fall (9,1 %) einen tumorverdächtigen Befund.

mFISH der Urinprobe negativ und des Tumormaterials positiv

Bei diesen 25 Fällen fanden sich 19 (76 %) pTa-, 6 (24 %) pT1-, 17 (68 %) G1-, 7 (28 %) G2- und 1 (4 %) G3-Tumor. Die zytologische Untersuchung erbrachte 17 (68 %) tumorverdächtige, 7 (28 %) nicht tumorverdächtige Ergebnisse. Eine Probe (4 %) war nicht auswertbar.

mFISH der Urinprobe positiv und des Tumormaterials negativ

In dieser Gruppe waren 2 (40 %) pTa-, 2 (40 %) pT1-, 1 (20 %) pT2a-, 3 (60 %) G1- und 2 (40 %) G2-Tumoren vorhanden. Die Zytologie erbrachte in einem Fall (20 %) einen tumorverdächtigen und in 4 Fällen (80 %) einen nicht tumorverdächtigen Befund (Tabelle 16).

Tabelle 16: Zytologie und mFISH der 8 Fälle mit negativem mFISH-Befund des Tumormaterials bei positivem (5 Fälle) oder nicht auswertbarem (3 Fälle) mFISH-Urinbefund mit Kommentar aus dem Auswertungsprotokoll; n. a. - nicht auswertbar

| Nr. | Histologie | | Zytologie | mFISH Urin | Anteil der Zellkernkategorien | | | Kommentar |
|-----|------------|----|-------------|------------|-------------------------------|----------|----------|---------------|
| | | | | | a (in %) | b (in %) | c (in %) | |
| 48 | pT2a | G1 | negativ | positiv | 0,0 | 0,0 | 10,0 | - |
| 72 | pTa | G1 | verdächtig | n. a. | 0,0 | 0,0 | 2,0 | - |
| 86 | pTa | G1 | negativ | n. a. | 0,0 | 2,0 | 6,0 | „Artefakte“ |
| 91 | pTa | G1 | verdächtig | positiv | 0,0 | 0,0 | 0,0 | - |
| 92 | pT1 | G2 | zweifelhaft | positiv | 4,5 | 0,0 | 4,5 | „wenig Kerne“ |
| 107 | pT1 | G2 | negativ | positiv | 6,1 | 8,2 | 6,1 | - |
| 133 | pTa | G1 | zweifelhaft | positiv | 0,0 | 0,0 | 2,0 | - |
| 138 | pTa | G2 | negativ | n. a. | 0,0 | 0,0 | 0,0 | - |

4.8. Verlauf der Fälle mit positivem mFISH-Urinbefund ohne histologischen Tumornachweis

Bei sieben Patienten fand sich bei der weitgefasstesten Interpretation der mFISH-Grenzwerte („erweiterte Grenzwerte“, Tabelle 11) ein positiver Urinbefund der mFISH ohne histologischen Tumornachweis. Fünf dieser Patienten entwickelten nach 8,7 bis 24,3 Monaten (Median: 15 Monate, SD: 5,98) einen histologisch nachweisbaren Tumor in der Harnblase. Ein Patient wurde 6 Jahre weiter nachkontrolliert ohne Tumornachweis. Bei einem Patienten liegen keine weiteren Nachsorgedaten vor.

Bei drei der Patienten mit Tumornachweis in der Harnblase wurde im weiteren Verlauf ein Tumor des oberen Harntraktes diagnostiziert. Eine Übersicht der Verlaufsdaten findet sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: Verlaufsdaten der Patienten mit positivem mFISH-Urinbefund und negativer Histologie; * mFISH positiv nach den erweiterten Kriterien („erweiterte Grenzwerte“, Tabelle 11)

| Nr. | Geschlecht | mFISH | Zytologie | Rezidiv | Tumorformel | Monate bis Rezidiv | Kommentar |
|-----|------------|----------|-------------|---------|-------------|--------------------|---|
| 12 | männlich | positiv | zweifelhaft | ja | pTa G1 | 15,00 | - |
| 28 | weiblich | positiv* | verdächtig | ja | pT1 G2 | 8,73 | nach 12 Monaten zusätzlich Nierenbeckentumor mit Lymphknotenmetastasen |
| 37 | weiblich | positiv | verdächtig | ja | pT1 G2 | 9,97 | Progression nach 84 Monaten, Zystektomie (pT4a G3 pN2) |
| 62 | männlich | positiv | negativ | ja | Cis (G3) | 20,40 | nach 44 Monaten zusätzlich Nierenbeckentumor und pulmonale Metastasen |
| 87 | männlich | positiv | positiv | ja | pTa G1 | 24,33 | nach 38 Monaten zusätzlich Nierenbeckentumor (pT1 G1), nach 47 Monaten Zystektomie (pT1 G1 pN2) |
| 53 | männlich | positiv* | negativ | unbek. | | | - |
| 68 | männlich | positiv | positiv | nein | | | nach 6 Jahren kein Tumornachweis |

5. Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse der mFISH-Untersuchung des Urins sowie der vergleichenden Urinzytologie präsentieren Informationen, die zur weiteren Einordnung der mFISH in der Diagnostik des Urothelkarzinoms beitragen. Des Weiteren ergeben sich aus dem Vergleich mit den parallel untersuchten Tumorgewebeproben Ansatzpunkte für eine Verbesserung dieses Tests.

Im Folgenden sollen diese einzelnen Ergebnisse kritisch hinterfragt, mit bereits publizierten Ergebnissen verglichen und mit der Frage nach ihrer Relevanz diskutiert werden.

5.1. Einordnung der Ergebnisse der mFISH-Untersuchung und der Urinzytologie

mFISH

Die an unserem Patientenkollektiv ermittelten Ergebnisse hinsichtlich der Sensitivität (49,5 %) und Spezifität (81,5 %) der mFISH über alle Tumorkategorien lassen sich mit bereits veröffentlichten Daten zu diesem Test bestätigen. So wird in verschiedenen Arbeiten über eine Sensitivität von 39,1 – 87 % und eine Spezifität von 85,3 – 100 % berichtet (Quellen siehe Tabelle 18). Auffällig dabei ist die erhebliche Schwankungsbreite der publizierten Ergebnisse.

Aus den Daten dieser Arbeit und der Literatur wird deutlich, dass pauschale Angaben über Sensitivität und Spezifität zur vergleichenden Beurteilung der Methode ungeeignet sind. Dies ergibt sich hauptsächlich durch die differente Zusammenstellung der Patientenkollektive.

Ein besserer Vergleich mit anderen Methoden und mit den Daten anderer Arbeiten kann nur durch ein differenziertes Betrachten der mFISH-Ergebnisse unter Berücksichtigung der T-Kategorie und des Malignitätsgrades erbracht werden, da hier unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten berichtet wurden.

Die vorliegende Untersuchung bestätigt, dass die Sensitivität des untersuchten uringebundenen Tests (wie auch die anderer uringebundener Tumormarkersysteme) für das Harnblasenkarzinom streng abhängig von der Invasionstiefe und dem

Differenzierungsgrad des Tumors ist (Schroeder et al. 2004, van Rhijn et al.2005, Simon et al. 2003).

Die Sensitivität des UroVysion Testkits ist auch in dieser Arbeit für invasive und schlecht differenzierte Tumoren deutlich höher als die für gut differenzierte nicht muskelinvasive Befunde. Dies deckt sich mit veröffentlichten Daten zu diesem Test. Auffällig ist in unserer Untersuchung eine im unteren Bereich liegende Sensitivität und Spezifität (Tabelle 18).

Besonders hervorzuheben ist, dass alle muskelinvasiven Befunde anhand der mFISH-Urinuntersuchung diagnostiziert werden konnten. Einschränkend ist jedoch zu beachten, dass die Anzahl dieser Befunde in dem untersuchten Kollektiv gering war (n = 10).

Tabelle 18: Literaturangaben zur Sensitivität und Spezifität der mFISH Untersuchungen des Urins mit dem Vysis UroVysion Testkit im Vergleich zur vorliegenden Arbeit; * auswertbare Fälle

| Fälle | Sensitivität Spezifität (%) | Sensitivität (%) | | | | | Quelle |
|-------|-----------------------------------|------------------|------------|---------------|------|------|---------------------|
| | | alle | pTa pT1 | mind. pT2a | G1 | G2 | |
| 86 | 80,4 85,3 | 64 100 | 100 | 53,3 | 83,3 | 100 | Placer et al. 2002 |
| 55 | 87 100 | 37,5 100 | 100 | - | - | - | Riesz et al. 2007 |
| 120 | 85 97 | 83 83 | 100 | 83 | 80 | 96 | Skacel et al. 2003 |
| 176 | 71 94,5 | 65,6 83,3 | 100 | 55 | 78 | 94 | Sarosdy et al. 2002 |
| 64 | 39,1 89,7 | 26,7 60 | 50 | 22,2 | 36,8 | 66,7 | Moonen et al. 2007 |
| 126* | 49,5 81,5 | 35,9 62,5 | 100 | 35,6 | 60,7 | 91,7 | vorliegende Arbeit |

Bei Zugrundelegung der „erweiterten Grenzwerte“ kann eine Verbesserung der Gesamtsensitivität von 49,5 % auf 60,6 % erreicht werden. Die Spezifität vermindert sich jedoch von 81,5 % auf 74,1 % deutlich unter den in der Literatur publizierten Bereich.

Bubendorf et al. (2001) untersuchten in einer Arbeit verschiedene mögliche Grenzwerte hinsichtlich ihrer Sensitivität bei muskelinvasiven und nicht invasiven Tumoren und hinsichtlich der Spezifität anhand einer Kontrollgruppe von Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie. In dieser Arbeit wurde ein Grenzwert von

12 %, dies entspricht mehr als 2 von 25 ausgezählten Kernen, mit nachweisbaren Veränderungen jeglicher Art (einschließlich eines haploiden Verlustes von 9p21) definiert. Er erreichte damit für pTa-Befunde eine Sensitivität von 72,9 %, für \geq pT1 von 100 % bei einer Spezifität von 97 %. Es ist jedoch zu beachten, dass die verwendeten Urinproben zum Teil als Spontanurin und zum Teil als Spülurin entnommen worden sind. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der Daten ein. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit den Herstellerkriterien gefunden werden.

Es bleibt zu konstatieren, dass bisher weitestgehend Uneinigkeit über einen exakten „cutoff“-Wert für diesen Test herrscht. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind am ehesten auf die differente Zusammenstellung der Patientenkollektive und die verschiedenen Modifikationen bei der Testdurchführung zurückzuführen. Durch weitere Untersuchungen mit definierten Kriterien kann es möglich sein, einen Bereich zu definieren, für den anhand der zugehörigen klinischen Daten Empfehlungen bezüglich der diagnostischen Konsequenzen abgeleitet werden können.

Urinzytologie

In ähnlicher Weise bestätigen sich die Ergebnisse hinsichtlich der Urinzytologie. So konnte in der vorliegenden Untersuchung eine Sensitivität von 41,5 % und Spezifität von 79,3 % ermittelt werden. In der Literatur finden sich differente Angaben mit erheblichen Schwankungen hinsichtlich der Sensitivität (z. B.: 20 – 53 %) und Spezifität zwischen 83 und 99 % (Lotan und Roehrborn 2003). Die hier zum Vergleich herangezogenen Arbeiten berichten über eine Sensitivität von 26 – 63,8 % und eine Spezifität von 79,3 – 89,7 % (Tabelle 19).

Tabelle 19: Literaturangaben zur Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie; * auswertbare Fälle

| Fälle | Sensitivität Spezifität (%) | Sensitivität (%) | | | | | Quelle |
|-------|-----------------------------------|------------------|---------------|------|------|------|---------------------|
| | | pTa pT1 | mind. pT2a | G1 | G2 | G3 | |
| 86 | 63,8 | 42,3 | 88,9 | 25 | 66,7 | 94,7 | Placer et al. 2002 |
| 83* | 86,1 | 91,7 | | | | | |
| 48* | 26 | 25 66 | 33,3 | 18 | 44 | 41 | Sarosdy et al. 2002 |
| 64 | 40,6 89,7 | 26,7 70 | 75 | 22,2 | 26,3 | 83,3 | Moonen et al. 2007 |
| 135* | 41,5 79,3 | 35,6 45,8 | 87,5 | 30,3 | 60 | 60 | vorliegende Arbeit |

Auch für die vergleichende Einordnung der Urinzytologie ist eine differenzierte Betrachtung hinsichtlich der Tumorqualität (Infiltrationstiefe (T) und Differenzierungsgrad (G)) zwingend erforderlich. Zumindest den Differenzierungsgrad betreffend herrscht Einigkeit, dass die Sensitivität bei entdifferenzierten Tumoren zunimmt. Auch eine deutlich bessere Aussage bezüglich des Vorhandenseins von invasiven Tumoren wird beschrieben (Lotan und Roehrborn 2003). So ist insbesondere bei pT1 G1 Tumoren in Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur von einer geringen Sensitivität der Urinzytologie auszugehen.

Wichtige Probleme bei der Einordnung der Zytologiebefunde sind unbestritten die erheblichen Schwankungen in der Sensitivität und Spezifität sowie die Intra- und Interuntersuchervarianz (Rathert 2003, Glatz et al. 2006). Besonders Letztere verdeutlicht den zum Teil subjektiven Charakter dieser Diagnostik.

Unter Beachtung der genannten Einschränkungen der Zytologie kann angenommen werden, dass die vorliegenden Ergebnisse der Urinzytologie als Vergleichsgröße zur Einordnung der mFISH verwendet werden können.

5.2. Vergleich der mFISH-Urinuntersuchung mit den Ergebnissen der Urinzytologie

Neben dem Vergleich der Sensitivität und Spezifität für die einzelnen Infiltrationstiefen und Differenzierungsgrade der Tumoren bietet der direkte Vergleich mit der Urinzytologie eine weitere Möglichkeit zur Einordnung der Methode.

Die Urinzytologie hat, trotz ihrer Einschränkungen, als einziges uringebundenes Nachweisverfahren in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms einen unbestrittenen Stellenwert. Da bisher kein anderes etabliertes uringebundenes diagnostisches Verfahren zur Verfügung steht, muss auch in dieser Arbeit auf diesen „Goldstandard“ als Vergleich zurückgegriffen werden (Bassi et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich unabhängig von den Tumoreigenschaften eine höhere Sensitivität (49,5 versus 41,5 %) der mFISH bei vergleichbarer Spezifität (81,5 und 79,3 %) im Vergleich zur Urinzytologie ermitteln. Diese Unterschiede lassen sich in den publizierten Daten in gleicher Weise nachvollziehen, obwohl auch hier eine große Schwankungsbreite bei Sensitivität und Spezifität zu verzeichnen ist (Tabellen 16 und 17).

Bei einer differenzierten Betrachtung hinsichtlich der Infiltrationstiefe ließ sich der Vorteil in der Sensitivität (mFISH und Urinzytologie) für pT1-Tumoren (62,5 und 45,8 %) und für muskelinvasive Tumoren (\geq pT2a) (100 und 87,5 %) deutlich darstellen. Einen Unterschied konnten auch Placer et al. (2002) (pT1: 100 versus 91,7 %, \geq pT2a: 100 versus 88,9 %) und Sarosdy et al. (2002) (pT1: 83,3 versus 66 %, \geq pT2a: 100 versus 33,3 %) ermitteln. Moonen et al. (2007) fanden jedoch ein konträres Ergebnis (pT1: 60 versus 70 %, \geq pT2a: 50 versus 75 %).

Keine sicheren Unterschiede zwischen mFISH und Zytologie waren bei den pTa-Befunden (35,9 und 35,6 %) zu verzeichnen. In der Literatur finden sich hier differente Angaben. Placer et al. (2002) fanden einen Vorteil der mFISH (64 versus 42,3 %). Sarosdy et al. (2002) konnten ebenfalls eine höhere Sensitivität (65,6 versus 25 %) der mFISH nachweisen. Moonen et al. (2007) hingegen sahen keinen Unterschied (26,7 versus 26,7 %).

Aufgeschlüsselt nach dem Differenzierungsgrad zeigten sich Unterschiede der Sensitivität im Sinne eines Vorteils der mFISH bei schlecht differenzierten Tumoren (G3 91,7 versus 60 %). Einen deutlichen Unterschied ermittelten auch Sarosdy et al. (2002) (94 versus 41 %). Placer et al. (2002) fanden ebenfalls einen Unterschied. Dieser fiel mit 100 zu 94,7 % jedoch nicht so deutlich aus. Moonen et al. (2007) konnten gar einen Nachteil der mFISH (66,7 versus 83,3 %) beobachten.

Es ist jedoch einschränkend zu beachten, dass es sich bei den untersuchten Patienten von Moonen et al. ausschließlich um Patienten aus der Tumornachsorge handelte. Über die vorausgegangenen Tumoren sind keine Daten verfügbar. Es bleibt jedoch zu vermuten, dass es sich bei einem Großteil um gut differenzierte, nicht muskelinvasive Urothelkarzinome handelte und somit nur wenige G3-Tumoren in die Untersuchung einfließen.

Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass die differenten Ergebnisse in den unterschiedlichen Arbeiten durch die unterschiedliche Zusammenstellung der Patientenkollektive bedingt ist.

Bei den G1- und G2-Tumoren ließen sich in dieser Arbeit die Unterschiede zwischen mFISH und Zytologie in der Sensitivität nicht so deutlich darstellen (G1: 35,6 versus 30,3 %, G2: 60,7 versus 60 %). Sarosdy et al. (2002) (G1: 55 versus 18 %, G2 78 versus 44 %) und Placer et al. (2002) (G1: 53,3 versus 25 %, G2 83,3 versus 66,6 %) fanden jedoch auch in diesen Gruppen deutliche Unterschiede. Entscheidend für

einen Vergleich ist die, wie bereits oben beschrieben, erheblichen Schwankungen unterliegende Sensitivität der Urinzytologie. In der hier vorliegenden Arbeit ist, im Vergleich zu den in der Literatur veröffentlichten Daten, eine relativ hohe Sensitivität bei den G1 und G2 Tumoren festzustellen. Somit relativiert sich der ermittelte geringe Unterschied zwischen mFISH und Urinzytologie bei diesen Tumoren.

Bei der Anwendung der „erweiterten Grenzwerte“ lässt sich eine Verbesserung der Sensitivität hinsichtlich der einzelnen Tumorkategorien erreichen (pTa: 46,9 %, pT1: 79,2 %, \geq pT2a: 100%, G1: 42,4 %, G2: 82,1 % und G3: 100 %). Hierdurch ergibt sich ein deutlicher Vorteil gegenüber der Urinzytologie. In der Folge kommt es jedoch zu der bereits erwähnten Verminderung der Spezifität im Vergleich zur Zytologie (79,3 %) von 81,5 auf 74,1 %.

5.3. Kombiniertes Einsatz der mFISH-Urinuntersuchung und der Urinzytologie

Bei Tumorverdacht in der Zytologie *oder* der mFISH auf der einen Seite und einem negativen mFISH- *und* Zytologiebefund auf der anderen Seite ergeben sich zusätzliche Informationen, die im klinischen Alltag Relevanz erlangen können. Durch die kombinierte Aussage beider Tests in oben beschriebener Weise konnte eine verbesserte Tumordetektion ermöglicht werden. Dies zeigt sich an einer Erhöhung der Sensitivität über alle Tumorkategorien auf 57,5 % (mFISH: 49,5 %, Zytologie: 41,5 %).

Auch die separate Betrachtung der einzelnen Tumorqualitäten bestätigt dies. So war eine deutlich höhere Sensitivität der Kombination beider Methoden für die pTa-Tumoren ersichtlich (Kombination: 46,2 %, mFISH: 30,9 %, Zytologie: 35,6 %). Besonders deutlich wirkte sich der Vorteil der Kombination beider Methoden in der Gruppe der klinisch als kritisch anzusehenden pT1-Tumoren aus. Hier konnte eine Sensitivität von 75 % (mFISH: 62,5 %, Zytologie: 45,8 %) erreicht werden. In der Gruppe der invasiven Tumoren war keine Verbesserung möglich, da bereits die mFISH allein eine Sensitivität von 100 % aufwies.

Bei einer Unterteilung hinsichtlich des Malignitätsgrades war dieser Trend bei den G1- (41,4 % versus mFISH 35,6 % und Zytologie: 30,3 %) und den G2-Tumoren

(80,7 % versus mFISH 60,7 % und Zytologie: 60 %) nachvollziehbar. Eine Verbesserung bei den G3-Tumoren im Vergleich zur mFISH allein war nicht zu erreichen, da die in der Zytologie auffälligen Proben bereits eine Teilmenge der positiven mFISH-Proben darstellten.

5.4. Untersuchungen am Tumormaterial

Urinbefunde

In der Untergruppe der parallel ausgewerteten mFISH-Untersuchungen des Tumormaterials fand sich ein differentes Ergebnis hinsichtlich der ermittelten Sensitivität der mFISH-Urinuntersuchung im Vergleich zu der des Gesamtkollektivs. Hier ist zu beachten, dass die Selektion der verwendeten Tumormaterialproben sich an zweckmäßigen Kriterien orientieren musste. Es konnten nur Tumorproben verwendet werden, bei denen sich das Material in der Tumorbank zur weiteren Verarbeitung eignete. Somit liegt die Vermutung nahe, dass sich eher Tumoren mit größerem Volumen in dieser Gruppe befanden, obgleich das nicht explizit untersucht worden ist.

Die Vermutung, dass der Unterschied auf eine andere Verteilung der Tumorkategorien in dieser Gruppe zurückführen sei, lässt sich nicht erhärten. Es finden sich ein etwas geringerer Anteil pT1-Tumoren (17,8 versus 21,2 %), ein vergleichbarer Anteil an pTa-Tumoren (69,9 versus 69,0 %) und sogar ein größerer an muskelinvasiven Befunden (12,3 versus 8,8 %). Hiermit kann die Differenz der Ergebnisse nicht erklärt werden. Auch die Unterschiede im Vergleich zum Gesamtkollektiv hinsichtlich des Differenzierungsgrades sind eher gering. Die Abbildungen 15 und 16 illustrieren diese bereits bei der Beschreibung des Patientenkollektivs dargestellte ähnliche Verteilung in beiden Gruppen.

Abbildung 15: Gegenüberstellung der Verteilung der Infiltrationstiefe (T) der Tumoren (oben: Subgruppe mit paralleler mFISH-Untersuchung des Tumormaterialies, unten: Gesamtkollektiv der Fälle mit Tumornachweis)

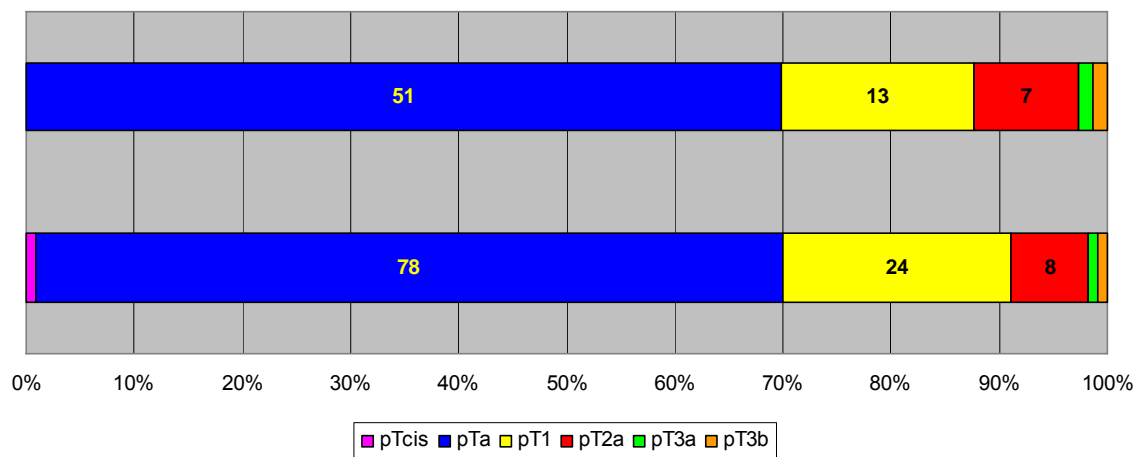
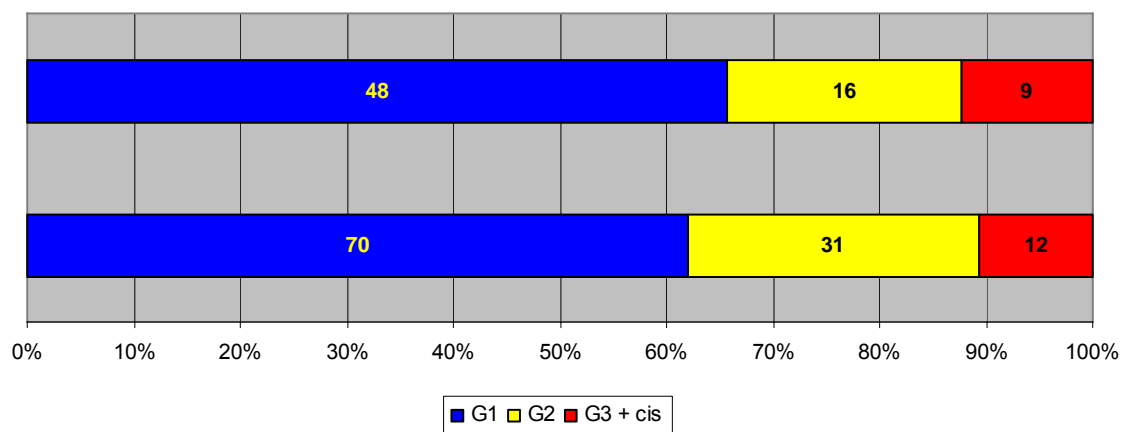


Abbildung 16: Gegenüberstellung der Verteilung des Differenzierungsgrades (G) der Tumoren (oben: Subgruppe mit paralleler mFISH-Untersuchung des Tumormaterialies, unten: Gesamtkollektiv der Fälle mit Tumornachweis)



Auch bei differenzierter Betrachtung hinsichtlich Infiltrationstiefe (T) und Differenzierungsgrad (G) ließen sich Unterschiede in der Sensitivität feststellen. Die Tabellen 20 und 21 sollen die Differenzen der bereits im Ergebnisteil dargestellten Daten veranschaulichen.

Tabelle 20: Gegenüberstellung der Sensitivität (%) der mFISH-Urinuntersuchung (Gesamtkollektiv / Untergruppe parallel untersuchtes Tumormaterial), unterschieden nach Infiltrationstiefe (T)

| | pTa | pT1 | pT2a | pT3a | pT3b |
|---------------------------|------|------|------|------|------|
| gesamtes Kollektiv | 35,9 | 62,5 | 100 | 100 | 100 |
| Untergruppe Tumormaterial | 32,6 | 46,2 | 100 | 100 | 100 |

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Sensitivität (%) der mFISH-Urinuntersuchung (Gesamtkollektiv / Untergruppe parallel untersuchtes Tumormaterial), unterschieden nach Differenzierungsgrad (G)

| | G1 | G2 | G3 |
|---------------------------|------|------|------|
| gesamtes Kollektiv | 35,6 | 60,7 | 91,7 |
| Untergruppe Tumormaterial | 34,1 | 46,7 | 88,9 |

Da diese Untergruppe offensichtlich nicht für das Gesamtkollektiv repräsentativ ist, kann der Vergleich zwischen Tumormaterial und Urinbefund nur innerhalb dieser Untergruppe erfolgen.

mFISH Ergebnisse im Tumormaterial

Anhand der mFISH-Untersuchung des Tumormaterials konnten mehr Tumoren nachgewiesen werden als durch die Urinuntersuchung in der entsprechenden Gruppe. Es fand sich eine deutlich höhere Sensitivität im Tumorgewebe (74 % versus 39,7 %).

Einschränkend ist jedoch zu beachten, dass andere Grenzwerte für die Untersuchung des Tumormaterials zu Grunde gelegt werden mussten, da dieser mFISH-Test lediglich für die Beurteilung zytologischer Präparate entwickelt wurde. Die verwendeten Auswertungskriterien (siehe Tabelle 11) wurden von Schwarz et al. (2004) evaluiert und kamen in der vorliegenden Untersuchung zur Anwendung.

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass kein gesundes Gewebe untersucht worden ist. Somit konnte hier keine Ermittlung der Spezifität des Tests erfolgen.

Korrelation zu Tumorkategorie (T) und Malignitätsgrad (G)

Wie bereits bei der globalen Betrachtung dieser Gruppe war auch bei der differenzierten Auswertung hinsichtlich der Tumoreigenschaften eine deutlich höhere Sensitivität im Tumormaterial zu verzeichnen.

Es ließ sich, wie bei den Urinuntersuchungen bereits festgestellt, mit einer zunehmenden Infiltrationstiefe und zunehmender Entdifferenzierung eine steigende Sensitivität der mFISH anhand der Untersuchungen des Tumormaterials ermitteln. Zum besseren Vergleich sind die bereits im Ergebnisteil dargestellten Daten in den Tabellen 22 und 23 gegenübergestellt.

Tabelle 22: Vergleich der Sensitivität (%) der mFISH im Tumormaterial und im Urin, unterschieden nach Infiltrationstiefe (T)

| mFISH | pTa | pT1 | pT2a | pT3a | pT3b |
|---------------------------|------|------|------|------|------|
| Urinuntersuchung | 32,6 | 46,2 | 100 | 100 | 100 |
| Tumormaterialuntersuchung | 70,6 | 76,9 | 85,7 | 100 | 100 |

Tabelle 23: Vergleich der Sensitivität (%) der mFISH im Tumormaterial und im Urin, unterschieden nach Differenzierungsgrad (G)

| mFISH | G1 | G2 | G3 |
|---------------------------|------|------|------|
| Urinuntersuchung | 34,1 | 46,7 | 88,9 |
| Tumormaterialuntersuchung | 68,8 | 75 | 100 |

Es fand sich lediglich eine Abweichung bei einem pT2a-Befund. Dieser Tumor konnte mithilfe der mFISH zwar im Urin, jedoch nicht im Tumormaterial nachgewiesen werden. In diesem Fall fanden sich im Tumormaterial bei nur 10 % (5 von 50 ausgezählten Zellkernen) homozygote Verluste von 9p21. Trotz der mikroskopischen Kontrolle der Präparate ist zu vermuten, dass der Tumoranteil in dieser Probe nicht ausreichend war, zumal sich in der zugehörigen Urinuntersuchung auch eine Polysomie der Chromosomen 3, 7, und 17 nachweisen ließ. Alternativ könnte auch ein anderer Tumorbefund oder ein anderer Anteil dieses Tumors für die Urinbefunde verantwortlich gewesen sein und die beschriebene Diskrepanz erklären.

5.5. Verschiedene Konstellationen bei der Untersuchung des Tumormaterials

Im Vergleich der Untersuchungsergebnisse der mFISH von Zellen aus dem Urin und von Tumorzellen aus den Operationspräparaten sind vier verschiedene Konstellationen möglich. Sie werden im Folgenden erläutert.

Das Zusammentreffen eines **positiven mFISH-Befundes der Urinprobe und des Tumormaterials** spiegelt das Grundprinzip aller zellbasierenden uringestützten Testverfahren für Blasentumoren wieder. Es gelangen Tumorzellen in für den Nachweis ausreichender Anzahl in den Urin und lassen sich im Sediment mit dem entsprechenden Test nachweisen.

Abgesehen von gut differenzierten, nicht muskulinvasiven Tumoren sollten sich in dieser Gruppe auch Parallelen zum Ergebnis der Urinzytologie erkennen lassen. So

fanden sich bei 17 von 24 Proben positive oder verdächtige zytologische Befunde. Die negativen Befunde lassen sich auf die bereits erwähnte geringere Sensitivität der Urinzytologie, insbesondere bei den gut differenzierten, nicht muskelinvasiven Befunden zurückführen.

Die im klinischen Alltag immer wieder als problematisch anzusehende Nichtauswertbarkeit der Urinzytologie (in dieser Gruppe bei immerhin 3 Proben) kann zum einen durch eine nicht ausreichende Anzahl von Zellen im Urin und zum anderen auf Autolyseprozesse der Zellen bei unzureichender Fixation der Urinprobe zurückzuführen sein. Da im Gegensatz zur Urinzytologie bei der mFISH keine Zellen und Zellverbände, sondern lediglich die Zellkerne und deren DNA beurteilt werden müssen ist dieser Einfluss von einem geringeren Stellenwert.

Lässt man diese 3 Fälle außer Acht, kann man eine Übereinstimmung mit der Urinzytologie in 81 % (17 von 21 Proben) erkennen. Diese Korrelation unterstützt das angenommene oben beschriebene Prinzip.

Eine weitere Möglichkeit ist das Zusammentreffen sowohl einer **negativen mFISH der Urinprobe und des Tumormaterials**. Diese Konstellation demonstriert eine kritische „Schwachstelle“ des verwendeten Tests. Entscheidend für dessen Sensitivität ist, dass die Veränderungen, welche mit dem Test nachgewiesen werden können, in den Tumorzellen vorhanden sind. Die Sonden des mFISH Vysis UroVysion Testkits sind im Rahmen ihrer Entwicklung aus verschiedenen untersuchten Sonden so gewählt worden, dass eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität erreicht werden konnte (Sokolova et al. 2000). Offensichtlich lagen jedoch bei diesen Zellen die entsprechenden genetischen Veränderungen nicht, oder nicht in ausreichender Anzahl vor.

Die hier dargestellte „diagnostische Lücke“ bei den nichtinvasiven (13 x bei pTa-, 1 x bei pT1-Tumoren) und gut differenzierten Tumoren (12 x G1, 2 x G2) ist bei ebenfalls fehlendem Nachweis der Veränderungen im Tumormaterial auf eine unzureichende Sensitivität der verwendeten Sonden zurückzuführen.

Daraus ergeben sich Ansätze zur Verbesserung des Tests, vor allem für die Detektion von gut differenzierten, nicht muskelinvasiven Tumoren. Bei diesen finden sich, wie bereits erwähnt, häufig verschiedene Veränderungen auf Chromosom 9 (Tsai et al. 1990, Cairns et al. 1993, Linnenbach et al. 1993). Mit dem vorliegenden Test ist jedoch nur der Verlust der 9p21-Region auf dem kurzen Arm nachweisbar.

Zusätzliche Sonden, welche Veränderungen anderer Lokalisationen erfassen, könnten die Sensitivität des Tests für pTa G1 Tumoren erhöhen. Die praktische Umsetzung wird jedoch durch nur wenige bekannte einfach nachweisbare Deletionen oder Amplifikationen erschwert. Bei einer Vielzahl der bekannten Veränderungen finden sich häufig Mutationen oder epigenetisch regulierte Transkriptionsveränderungen von dort codierten Genen. Einige Arbeiten beschreiben auch umschriebene Deletionen oder einen LOH (9q34 – Habuchi et al. 1995, 9q22.3 und 9q31 – Simoneau et al. 1999). Hier ergibt sich ein möglicher Ansatzpunkt zur Optimierung dieses Tests.

Ein **negativer mFISH-Befund der Urinprobe und ein positiver Befund des Tumormaterials** illustriert die Problematik aller zellbasierenden urineingebundenen Tumornachweissysteme beim Urothelkarzinom. Der Übergang einer ausreichenden Anzahl von Tumorzellen in den Urin ist eine wichtige Grundvoraussetzung für die Tumordetektion. Bei den 25 Fällen mit dieser Konstellation (19 pTa-, 6 pT1- bzw. 17 G1-, 7 G2- und einem G3-Tumor) waren die Tumorzellkerne im Urin mit der mFISH nicht nachweisbar, obwohl im parallel untersuchten Tumormaterial die entsprechenden genetischen Veränderungen nachgewiesen werden konnten. Auch hier finden sich Parallelen zur Urinzytologie. Diese erbrachte nur in 4 Fällen einen positiven und in 3 Fällen einen verdächtigen Befund. Wie bereits erwähnt, ist jedoch zu beachten, dass diese Parallelen bei den pTa G1 Tumoren aufgrund der dort geringen Sensitivität der Zytologie nicht zu verwerten sind.

Nicht sicher zu klären ist das gleichzeitige Auftreten von **positiven mFISH-Befunden der Urinprobe bei negativen Befunden des Tumormaterials**. In diesen Fällen wurden Tumorzellen mit den entsprechenden nachweisbaren genetischen Veränderungen im Urin gefunden. Die Befunde ließen sich jedoch anhand des untersuchten Tumormaterials nicht nachvollziehen.

Als mögliche Ursache kommt in Betracht, dass die nachgewiesenen Tumorzellen im Urin von einem anderen Tumor stammen als die untersuchte Tumormaterialprobe. Bei häufig multifokalem Auftreten von Urothelkarzinomen mit der Möglichkeit eines zum Teil unterschiedlichen genetischen Tumorprofils ist es vorstellbar, dass die genetischen Veränderungen der untersuchten Tumorprobe mit dem verwendeten mFISH-Kit nicht nachweisbar sind.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass trotz des mikroskopischen Nachweises von Tumorgewebe im präparierten Material, insbesondere bei kleinen Gewebemengen, das aufgearbeitete Material unzureichend war. Zumindest bei einem dieser Fälle ließen sich nur sehr wenige Zellkerne darstellen (Tabelle 16).

Unter Berücksichtigung oben genannter Aspekte bleiben 4 Befunde mit unsicherer Ursache für einen negativen Befund aus dem Tumormaterial bei positivem mFISH-Urinbefund.

5.6. Prognose bei positivem mFISH-Befund

Bei den retrospektiv ausgewerteten Fällen mit positivem mFISH-Urinbefund ohne histologischen Tumornachweis ist die Häufigkeit von späteren Tumorrezidiven, vor allem die häufige Progression der Erkrankung und die überdurchschnittlich hohe Beteiligung des oberen Harntraktes auffällig. Für eine abschließende Aussage über die prognostische Bedeutung ist die Anzahl der Fälle jedoch unzureichend. Diese müssten anhand eines größeren Patientenkollektivs und mit prospektiver Herangehensweise evaluiert werden. Sie illustrieren jedoch den klinischen Verlauf, welcher häufig Tumorrezidive mit sich bringt.

Sarosdy et al. (2002) konnte, bei allerdings geringer Fallzahl (7 von 11 Fällen) mit dieser Konstellation zeigen, dass ein positiver mFISH-Urinbefund bei unauffälligem zystoskopischem Befund einem sichtbaren Tumor häufig vorausgeht. Es gibt jedoch auch Angaben in der Literatur die darauf hindeuten, dass die Sensitivität des Vysis UroVysion Testkits mit einer Auswertung nach den Herstellerkriterien für diese Fragestellung nicht ausreicht (Zellweger et al. 2006). Lediglich die Deletion 9p21 stellte sich in dieser Arbeit als signifikant für ein später histologisch bestätigtes Rezidiv heraus. Diese Veränderung ist typisch für nichtinvasive „low-grade“ Tumoren, welche von Seiten ihres biologischen Verhaltens schon zu häufigen Rezidiven neigen.

Besonders herauszustellen sind die Fälle mit den im Intervall diagnostizierten Nierenbeckentumoren (bei 3 von 5 Fällen mit späterem Tumornachweis). Dabei ist zu beachten, dass das hier verwendete mFISH-Testsystem nicht für die Diagnostik des oberen Harntraktes zugelassen ist. Es lässt sich jedoch vermuten, dass anhand der Urinbefunde auch hierüber Aussagen gemacht werden können, da urotheliale

Malignome des oberen Harntraktes ähnliche genetische Veränderungen aufweisen sollten.

Zu diesem Thema gibt es bisher nur wenige veröffentlichte Arbeiten (Chen und Grasso 2008, Akkad et al. 2007, Marín-Aguilera et al. 2007) mit insgesamt nur geringen Fallzahlen (43, 16 und 49 Patienten). Es wird über eine Sensitivität, je nach Art der Uringewinnung, von 35 – 87,5 % und eine Spezifität 33 – 94,7 % berichtet. Parallelen zu den Befunden der Urinzytologie sind in diesen Arbeiten ebenfalls zu beobachten.

In der vorliegenden Arbeit kann aufgrund der geringen Fallzahl kein Zusammenhang mit den Befunden der Urinzytologie dargestellt werden.

6. Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die Bewertung des diagnostischen Stellenwertes der mFISH-Untersuchung in der Diagnostik des Urothelkarzinoms.

Der in dieser Arbeit evaluierte Test ist unter Beachtung der Besonderheiten und Einschränkungen für die uringestützte Diagnostik von Urothelkarzinomen der Harnblase geeignet. Verschiedene Vorteile gegenüber der konventionellen Diagnostik sind vorhanden. Aus den vorliegenden Ergebnissen ergeben sich zusätzlich Ansatzpunkte zur Verbesserung des Tests.

Die Sensitivität des UroVysion Tests für die uringestützte Detektion von Urothelkarzinomen steigt mit zunehmender Entdifferenzierung und Invasionsstiefe des Tumors. Muskelinvasive Tumoren können mit dieser Methode sicher nachgewiesen werden.

Im Vergleich zur Urinzytologie weist der Test eine höhere Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität auf. Zudem sind technische Probleme bei der Probenpräparation und –lagerung, wie sie bei der Urinzytologie bedeutend sind, nur von geringem Einfluss. Des Weiteren fallen die subjektiven Aspekte, wie sie deutlich bei zytologischen Untersuchungen zum Tragen kommen, nur sehr gering ins Gewicht.

Die Kombination der mFISH mit einer konventionellen Urinzytologie bietet eine weitere Möglichkeit, die Sensitivität der noninvasiven Urindiagnostik bei Urothelkarzinomen zu erhöhen. Insbesondere in unklaren Fällen kann als Entscheidungshilfe hinsichtlich des weiteren Vorgehens hierauf zurückgegriffen werden. Somit kann die mFISH auch als ergänzendes Verfahren im Monitoring von Urothelkarzinomen der Harnblase eingesetzt werden.

Bei der Anwendung des Tests an präparierten Zellkernen aus dem Tumormaterial lässt sich ebenfalls eine gute Sensitivität der mFISH ermitteln. Auch hier findet sich eine steigende Sensitivität mit zunehmender Invasionsstiefe und Differenzierungsgrad. Durch den Vergleich mit den Urinbefunden konnten die beiden Hauptursachen für falsch negative Befunde dieser Urindiagnostik dargestellt werden.

Zum einen ist bei den nicht muskelinvasiven gut bis mäßig differenzierten Tumoren durch die Auswahl der verwendeten Sonden die Einschränkung in der Sensitivität zu erklären. Frühe genetische Veränderungen des Urothelkarzinoms werden durch diese zum Teil nicht erfasst. Mit dem Einsatz entsprechender zusätzlicher Sonden (z.B. weitere Lokalisationen auf Chromosom 9) ist eine Verbesserung der Sensitivität prinzipiell möglich.

Zum anderen verdeutlicht sich anhand der Daten ein Hauptproblem der urinbasierenden Nachweisverfahren. So ist insbesondere bei den nicht muskelinvasiven Tumoren die Anzahl veränderter Zellen im Urin nicht immer ausreichend, um einen Tumornachweis zu erbringen. Im Bezug auf diese Problematik sind die Verbesserungsmöglichkeiten eingeschränkt. Eventuell kann die Sensitivität durch die Entnahme von Spülurin verbessert werden. Hierzu ist jedoch ein invasives Vorgehen erforderlich.

Bei der Auswertung der Verlaufsdaten ergab sich der Verdacht, dass ein positiver mFISH-Befund ohne sicheren Tumornachweis einem „sichtbaren“ Tumorrezidiv vorausgehen kann. In diesen Fällen müssten die Nachsorgeintervalle verringert werden.

Des Weiteren sollte bei der Anwendung der mFISH zusätzlich eine „strengere“ Beurteilung der Befunde mindestens entsprechend der „erweiterten Grenzwerte“ erfolgen, da keine einheitliche Aussage zu den anzuwendenden „cutoff“-Werten vorliegt. Bei einem Nachweis von auffälligen Zellkernen in einer geringeren Anzahl als für einen positiven mFISH-Befund gefordert, muss die Indikation zur situationsangepassten Ausschöpfung der diagnostischen Möglichkeiten geprüft werden. Insbesondere sollte eine Intensivierung der Abklärung des oberen Harntraktes erfolgen. Auch bei fehlendem klinischem Korrelat kann das Vorliegen eines makroskopisch nicht fassbaren Urothelkarzinoms nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall ist zumindest eine Verkürzung der Kontrollintervalle zu empfehlen.

7. Ausblick

Der hier untersuchte Test stellt bei der Anwendung unter einer korrekten Indikationsstellung eine sinnvolle Verknüpfung der Erkenntnisse der molekularbiologischen Tumorforschung mit dem klinischen Alltag dar. In der weiteren Konsequenz kann in Anbetracht der verfügbaren umfangreichen Daten über genetische Veränderungen beim Urothelkarzinom eine Verbesserung der diagnostischen Sicherheit, insbesondere im Hinblick auf die gut differenzierten, nicht muskelinvasiven Tumoren, erreicht werden. Hier sind weitere Entwicklungen zu erwarten, die vielversprechend die Primärdiagnostik und Nachsorge verbessern können.

Durch prospektive Untersuchungen mit Augenmerk auf den klinischen Verlauf sollte es gelingen, die Grenzwerte für diesen Test so zu definieren, dass hieraus differente diagnostische und therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden können, wie zum Beispiel Empfehlungen für Nachsorge- und Kontrollintervalle. Die Definition einer „Grauzone“, ähnlich wie beim PSA-Wert in der Diagnostik des Prostatakarzinoms, wäre ebenfalls denkbar.

Ein weiterer, zum Teil schon angewandter Einsatz dieser Diagnostik stellt die Abklärung des oberen Harntraktes (Nierenbecken und Ureter) dar. Im klinischen Alltag ist dies oft eine erhebliche Herausforderung. Häufig ergeben sich zunächst Verdachtsmomente anhand von Befunden der Bildgebung (Sonographie und Röntgen) oder bei auffälligem Urinbefund (Hämaturie oder tumorverdächtige Urinzytologie) und gleichzeitig zystoskopisch unauffälliger Harnblase. Die weitere notwendige Diagnostik (retrograde Ureteropyelographie oder eine Ureterorenoskopie) ist invasiv und kann einen Tumor nur selten definitiv ausschließen. Komplizierend kommt hinzu, dass mitunter die Seitenzuordnung (rechts oder linkes Hohlssystem) nicht sicher möglich ist. Bei einer deutlich besseren Sensitivität der mFISH im Vergleich zur Urinzytologie eröffnen sich neue Möglichkeiten der seitengetrenten Urinuntersuchung des oberen Harntraktes. Da dieser Einsatz jedoch noch unzureichend evaluiert ist, sind hier weitere Untersuchungen notwendig. Das Grundprinzip der Methode legt die Vermutung nah, dass hier ein weiteres Einsatzgebiet mit deutlichem diagnostischen Benefit erschlossen werden kann.

Nicht unerwähnt bleiben sollte auch der Ansatzpunkt, über eine differenzierte Erfassung der genetischen Veränderungen des Tumors ein „genetisches Tumorprofil“ zu erstellen. Daraus resultierend könnten Aussagen zur Prognose und zu möglichen lokalen und systemischen Therapieansätzen im Sinne einer adjuvanten, kurativen oder palliativen Therapie abgeleitet werden.

Tabellen:

Tabelle 24: Urinzytologie (gesamtes Kollektiv)

| Zytologie | n | % |
|--------------------------|----|------|
| negativ | 69 | 47,9 |
| zweifelhaft | 16 | 11,1 |
| verdächtig | 24 | 16,7 |
| positiv | 26 | 18,1 |
| keine Auswertung möglich | 9 | 6,3 |

Tabelle 25: Ergebnisse der mFISH-Urinuntersuchung gegliedert nach Ausdehnung des Primärtumors (T), unterteilt nach verschiedenen Grenzwerten (Tabelle 11); richtig negativ, und richtig positiv fett gedruckt

| | | mFISH negativ | | mFISH positiv | | mFISH nicht auswertbar | | Summe |
|-----------------------|------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------------------|-------|-------|
| | | N | % | n | % | n | % | |
| Vysis | kein Tumor | 22 | 70,97 | 5 | 16,13 | 4 | 12,90 | 31 |
| | pTa | 41 | 52,56 | 23 | 29,49 | 14 | 17,95 | 78 |
| | pT1 | 9 | 37,50 | 15 | 62,50 | 0 | 0 | 24 |
| | pT2a | 0 | 0 | 8 | 100 | 0 | 0 | 8 |
| | pT3a | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| | pT3b | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| | pTis | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| erweiterte Grenzwerte | kein Tumor | 20 | 64,52 | 7 | 22,58 | 4 | 12,90 | 31 |
| | pTa | 34 | 43,59 | 30 | 38,46 | 14 | 17,95 | 78 |
| | pT1 | 5 | 20,83 | 19 | 79,17 | 0 | 0 | 24 |
| | pT2a | 0 | 0 | 8 | 100 | 0 | 0 | 8 |
| | pT3a | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| | pT3b | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| | pTis | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |

Tabelle 26: Ergebnisse der mFISH-Urinuntersuchung gegliedert nach Grading (G), unterteilt nach verschiedenen Grenzwerten (Tabelle 11); richtig negativ, und richtig positiv fett gedruckt

| | | mFISH negativ | | mFISH positiv | | mFISH nicht auswertbar | | Summe |
|-----------------------|------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------------------|-------|-------|
| | | N | % | n | % | n | % | |
| Vysis | kein Tumor | 22 | 70,97 | 5 | 16,13 | 4 | 12,90 | 31 |
| | G1 | 38 | 54,29 | 21 | 30,00 | 11 | 15,71 | 70 |
| | G2 | 11 | 35,48 | 17 | 54,84 | 3 | 9,68 | 31 |
| | G3 | 1 | 8,33 | 11 | 91,67 | 0 | 0 | 12 |
| erweiterte Grenzwerte | kein Tumor | 20 | 64,52 | 7 | 22,58 | 4 | 12,90 | 31 |
| | G1 | 34 | 48,57 | 25 | 35,71 | 11 | 15,71 | 70 |
| | G2 | 5 | 16,13 | 23 | 74,19 | 3 | 9,68 | 31 |
| | G3 | 0 | 0 | 12 | 100 | 0 | 0 | 12 |

Tabelle 27: Urinzytologie (gesamtes Kollektiv) im Vergleich zum histologischen Befund der transurethralen Tumorresektion

| Zytologie | Tumorverdacht | | | | kein Tumorverdacht | | | | nicht auswertbar | | Summe |
|--------------|---|----------------|--|-------|--------------------|----------------|---------------------------------|-------|------------------|-------|-------|
| | positiv (n ₁) verdächtig (n ₂) | | negativ (n ₃) zweifelhaft (n ₄) | | n ₃ | | n ₃ + n ₄ | | | | |
| Histologie | n ₁ | n ₂ | n ₁ +n ₂ | % | n ₃ | n ₄ | n ₃ + n ₄ | % | n ₅ | % | |
| pTa | 13 | 13 | 26 | 33,33 | 39 | 8 | 47 | 60,26 | 5 | 6,41 | 78 |
| pT1 | 5 | 6 | 11 | 45,83 | 8 | 5 | 13 | 54,17 | 0 | 0 | 24 |
| pT2a | 5 | 2 | 7 | 87,50 | 1 | 0 | 1 | 12,50 | 0 | 0 | 8 |
| pT3a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 |
| pT3b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 |
| pTis | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| | | | | | | | | | | | |
| G1 | 9 | 11 | 20 | 28,57 | 37 | 9 | 46 | 65,71 | 4 | 5,71 | 70 |
| G2 | 10 | 8 | 18 | 58,06 | 9 | 3 | 12 | 38,71 | 1 | 3,23 | 31 |
| G3 | 4 | 2 | 6 | 50 | 3 | 1 | 4 | 33,33 | 2 | 16,67 | 12 |
| | | | | | | | | | | | |
| kein Tumor | 3 | 3 | 6 | 19,35 | 20 | 3 | 23 | 74,19 | 2 | 6,45 | 31 |
| | | | | | | | | | | | |
| Summe | 26 | 24 | 50 | 34,72 | 69 | 16 | 85 | 59,03 | 9 | 6,25 | 144 |

Tabelle 28: Vergleich der Ergebnisse der Urinzytologie mit den Ergebnissen der mFISH-Untersuchung des Urins im Bezug auf den histologischen Befund der transurethralen Tumorresektion; +: Befund positiv, -: Befund negativ, n. a.: nicht auswertbar

| Histologie | Zytologie + mFISH + | Zytologie - mFISH - | Zytologie - mFISH + | Zytologie + mFISH - | mFISH n. a. | Zytologie n. a. |
|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------|--------------------|
| pTa | 13 | 28 | 9 | 9 | 14 | 5 |
| pT1 | 8 | 6 | 7 | 3 | | |
| pT2a | 7 | | 1 | | | |
| pT3a | | | | | | 1 |
| pT3b | | | | | | 1 |
| pTis | | | 1 | | | |
| G1 | 12 | 29 | 9 | 5 | 11 | 4 |
| G2 | 10 | 4 | 6 | 7 | 3 | 1 |
| G3 | 6 | 1 | 3 | | | 2 |
| | | | | | | |
| Tumornachweis | 28 | 34 | 18 | 12 | 14 | 7 |
| | | | | | | |
| kein Tumornachweis | 3 | 17 | 2 | 3 | 4 | 2 |
| | | | | | | |
| Summe | 31 | 51 | 20 | 15 | 18 | 9 |

Tabelle 29: Kombination von Urinzytologie und mFISH-Untersuchung des Urins gegliedert nach lokaler Tumorausbreitung (T) und Grading (G); Tumorverdacht: Zytologie „positiv“ oder „verdächtig“ oder mFISH positiv, kein Tumorverdacht: Zytologie „negativ“ oder „zweifelhaft“ und mFISH negativ

| Histologie | kein Tumorverdacht | | Tumorverdacht | | Summe |
|-------------------|--------------------|-------|---------------|-------|-------|
| | n | % | n | % | |
| pTis | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 |
| pTa | 42 | 53,85 | 36 | 46,15 | 78 |
| pT1 | 6 | 25 | 18 | 75 | 24 |
| pT2a | 0 | 0 | 8 | 100 | 8 |
| pT3a | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 |
| pT3b | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 |
| G1 | 41 | 58,57 | 29 | 41,43 | 70 |
| G2 | 6 | 19,35 | 25 | 80,65 | 31 |
| G3 | 1 | 8,33 | 11 | 91,67 | 12 |
| kein Tumor | 23 | 74,19 | 8 | 25,81 | 31 |

Tabelle 30: Ergebnis der mFISH-Untersuchung des Tumormaterials gegliedert nach Tiefeninfiltration (T) und Tumorgrading (G)

| Histologie | mFISH negativ | | mFISH positiv | | Summe |
|--------------|---------------|-------|---------------|-------|-------|
| | n | % | n | % | |
| pTa | 15 | 29,41 | 36 | 70,59 | 51 |
| pT1 | 3 | 23,08 | 10 | 76,92 | 13 |
| pT2a | 1 | 14,29 | 6 | 85,71 | 7 |
| pT3a | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 |
| pT3b | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 |
| G1 | 15 | 31,25 | 33 | 68,75 | 48 |
| G2 | 4 | 25 | 12 | 75 | 16 |
| G3 | 0 | 0 | 9 | 100 | 9 |
| Summe | 19 | 26,03 | 54 | 73,97 | 73 |

Tabelle 31: Übersicht aller untersuchten Fälle (Histologie, Urinzytologie und mFISH-Untersuchungen des Urins); k.T. - kein Tumornachweis, n.a. - nicht auswertbar

| Nr. | Geschlecht | Alter | Histologie | Zytologie | Ergebnis mFISH | | |
|-----|------------|-------|------------|-----------|----------------|-----------------------|---------|
| | | | | | Vysis | erweiterte Grenzwerte | |
| 1 | männlich | 76 | k.T. | | zweifelhaft | negativ | negativ |
| 2 | weiblich | 87 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 3 | weiblich | 81 | pTa | G1 | verdächtig | negativ | negativ |
| 4 | männlich | 73 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 5 | männlich | 73 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 6 | weiblich | 77 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 7 | männlich | 71 | k.T. | | n.a. | negativ | negativ |
| 8 | weiblich | 80 | pTa | G1 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 9 | weiblich | 70 | pTa | G1 | verdächtig | negativ | negativ |
| 10 | weiblich | 52 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 11 | männlich | 60 | k.T. | | negativ | n.a. | n.a. |
| 12 | männlich | 74 | k.T. | | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 13 | männlich | 66 | k.T. | | zweifelhaft | negativ | negativ |
| 14 | männlich | 62 | pT1 | G2 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 15 | männlich | 82 | pT1 | G2 | verdächtig | positiv | positiv |
| 16 | weiblich | 60 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 17 | männlich | 72 | pT2a | G3 | verdächtig | positiv | positiv |
| 18 | männlich | 85 | pTa | G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 19 | männlich | 85 | pTa | G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 20 | männlich | 72 | pTa | G1 | verdächtig | negativ | negativ |
| 21 | männlich | 75 | pTa | G2 | n.a. | positiv | positiv |
| 22 | weiblich | 65 | pT1 | G2 | verdächtig | positiv | positiv |
| 23 | männlich | 71 | pT2a | G3 | positiv | positiv | positiv |
| 24 | männlich | 66 | k.T. | | n.a. | negativ | negativ |
| 25 | männlich | 76 | pT1 | G2 | verdächtig | negativ | negativ |
| 26 | männlich | 71 | pTa | G1 | negativ | negativ | positiv |
| 27 | weiblich | 87 | pTa | G1 | n.a. | negativ | negativ |
| 28 | weiblich | 60 | k.T. | | verdächtig | negativ | positiv |
| 29 | männlich | 76 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 30 | weiblich | 50 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 31 | männlich | 65 | k.T. | | negativ | n.a. | n.a. |
| 32 | männlich | 77 | pTa | G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 33 | männlich | 85 | pTa | G1 | positiv | positiv | positiv |
| 34 | weiblich | 72 | pTa | G2 | negativ | n.a. | n.a. |
| 35 | männlich | 83 | pT2a | G3 | positiv | positiv | positiv |
| 36 | weiblich | 70 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 37 | weiblich | 69 | k.T. | | verdächtig | positiv | positiv |
| 38 | männlich | 67 | pTa | G1 | negativ | positiv | positiv |
| 39 | männlich | 79 | pTa | G2 | verdächtig | positiv | positiv |
| 40 | männlich | 74 | pTa | G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 41 | weiblich | 63 | pTa | G1 | negativ | positiv | positiv |
| 42 | männlich | 78 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 43 | männlich | 72 | pT1 | G2 | positiv | negativ | positiv |
| 44 | männlich | 71 | pTa | G1 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 45 | weiblich | 58 | pTa | G1 | zweifelhaft | negativ | negativ |
| 46 | männlich | 77 | pTa | G1 | positiv | n.a. | n.a. |
| 47 | weiblich | 21 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 48 | männlich | 89 | pT2a | G1 | negativ | positiv | positiv |
| 49 | männlich | 52 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 50 | männlich | 80 | pTa | G1 | positiv | positiv | positiv |

Tabelle 31 Fortsetzung: Übersicht aller untersuchten Fälle (Histologie, Urinzytologie und mFISH-Untersuchungen des Urins); k.T. - kein Tumornachweis, n.a. - nicht auswertbar

| | | | | | | | |
|-----|----------|----|------|----|-------------|---------|---------|
| 51 | weiblich | 80 | k.T. | | verdächtig | negativ | negativ |
| 52 | männlich | 59 | pT1 | G2 | negativ | negativ | negativ |
| 53 | männlich | 65 | k.T. | | negativ | negativ | positiv |
| 54 | männlich | 69 | pTa | G1 | negativ | n.a. | n.a. |
| 55 | männlich | 79 | pTa | G2 | negativ | negativ | positiv |
| 56 | männlich | 68 | pT2a | G3 | verdächtig | positiv | positiv |
| 57 | männlich | 73 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 58 | männlich | 75 | pTa | G1 | zweifelhaft | negativ | negativ |
| 59 | weiblich | 82 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 60 | weiblich | 57 | pT2a | G2 | positiv | positiv | positiv |
| 61 | weiblich | 73 | k.T. | | positiv | negativ | negativ |
| 62 | männlich | 76 | k.T. | | negativ | positiv | positiv |
| 63 | weiblich | 86 | pT1 | G2 | verdächtig | negativ | positiv |
| 64 | männlich | 68 | pTa | G1 | verdächtig | n.a. | n.a. |
| 65 | männlich | 78 | k.T. | | negativ | n.a. | n.a. |
| 66 | weiblich | 73 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 67 | weiblich | 82 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 68 | männlich | 66 | k.T. | | positiv | positiv | positiv |
| 69 | weiblich | 77 | pTa | G1 | positiv | negativ | negativ |
| 70 | weiblich | 40 | k.T. | | negativ | n.a. | n.a. |
| 71 | männlich | 86 | pTa | G1 | n.a. | negativ | positiv |
| 72 | männlich | 28 | pTa | G1 | verdächtig | n.a. | n.a. |
| 73 | männlich | 68 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 74 | männlich | 76 | pTa | G2 | verdächtig | negativ | negativ |
| 75 | weiblich | 71 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 76 | weiblich | 88 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 77 | männlich | 68 | pTa | G1 | negativ | n.a. | n.a. |
| 78 | weiblich | 71 | k.T. | | negativ | negativ | negativ |
| 79 | männlich | 62 | pT1 | G2 | positiv | positiv | positiv |
| 80 | männlich | 55 | pTa | G1 | negativ | n.a. | n.a. |
| 81 | weiblich | 67 | pT1 | G2 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 82 | männlich | 75 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 83 | männlich | 63 | pTa | G1 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 84 | männlich | 80 | pTa | G2 | positiv | positiv | positiv |
| 85 | männlich | 76 | pT1 | G2 | negativ | negativ | negativ |
| 86 | männlich | 60 | pTa | G1 | negativ | n.a. | n.a. |
| 87 | männlich | 74 | k.T. | | positiv | positiv | positiv |
| 88 | weiblich | 86 | pTa | G1 | verdächtig | negativ | negativ |
| 89 | weiblich | 73 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 90 | männlich | 68 | pTa | G2 | positiv | negativ | positiv |
| 91 | männlich | 52 | pTa | G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 92 | männlich | 58 | pT1 | G2 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 93 | männlich | 78 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 94 | männlich | 74 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 95 | männlich | 41 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 96 | männlich | 79 | pTa | G2 | negativ | positiv | positiv |
| 97 | männlich | 59 | pTa | G1 | n.a. | negativ | negativ |
| 98 | weiblich | 81 | pT3b | G3 | n.a. | positiv | positiv |
| 99 | männlich | 66 | pT3a | G3 | n.a. | positiv | positiv |
| 100 | männlich | 56 | pTa | G1 | zweifelhaft | negativ | negativ |
| 101 | männlich | 72 | pTa | G1 | positiv | positiv | positiv |
| 102 | männlich | 60 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 103 | männlich | 92 | pT1 | G3 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 104 | männlich | 72 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 105 | männlich | 61 | pTa | G1 | negativ | n.a. | n.a. |

Tabelle 31 Fortsetzung: Übersicht aller untersuchten Fälle (Histologie, Urinzytologie und mFISH-Untersuchungen des Urins); k.T. - kein Tumornachweis, n.a. - nicht auswertbar

| | | | | | | |
|-----|----------|----|---------|-------------|---------|---------|
| 106 | männlich | 57 | pTa G1 | negativ | n.a. | n.a. |
| 107 | männlich | 41 | pT1 G2 | negativ | positiv | positiv |
| 108 | männlich | 51 | pTis G3 | negativ | positiv | positiv |
| 109 | männlich | 76 | pT1 G3 | negativ | positiv | positiv |
| 110 | männlich | 73 | pTa G1 | negativ | positiv | positiv |
| 111 | männlich | 69 | pTa G1 | n.a. | negativ | negativ |
| 112 | männlich | 77 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 113 | männlich | 72 | pT1 G2 | negativ | positiv | positiv |
| 114 | männlich | 68 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 115 | männlich | 70 | pTa G1 | negativ | n.a. | n.a. |
| 116 | männlich | 79 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 117 | männlich | 82 | pT2a G3 | positiv | positiv | positiv |
| 118 | männlich | 62 | pT1 G1 | zweifelhaft | negativ | negativ |
| 119 | weiblich | 52 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 120 | männlich | 78 | pT1 G2 | verdächtig | positiv | positiv |
| 121 | männlich | 72 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 122 | weiblich | 66 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 123 | männlich | 63 | pTa G1 | positiv | positiv | positiv |
| 124 | männlich | 59 | pT1 G1 | positiv | positiv | positiv |
| 125 | weiblich | 78 | pT1 G1 | negativ | negativ | negativ |
| 126 | männlich | 76 | pT1 G1 | positiv | positiv | positiv |
| 127 | männlich | 64 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 128 | weiblich | 62 | pTa G2 | positiv | negativ | negativ |
| 129 | weiblich | 58 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 130 | männlich | 75 | pTa G1 | negativ | n.a. | n.a. |
| 131 | weiblich | 66 | pT1 G2 | negativ | negativ | positiv |
| 132 | weiblich | 73 | pTa G1 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 133 | weiblich | 78 | pTa G1 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 134 | weiblich | 74 | pTa G1 | positiv | positiv | positiv |
| 135 | männlich | 77 | k.T. | negativ | negativ | negativ |
| 136 | männlich | 79 | pT1 G2 | verdächtig | positiv | positiv |
| 137 | männlich | 87 | pT2a G3 | positiv | positiv | positiv |
| 138 | männlich | 64 | pTa G2 | negativ | n.a. | n.a. |
| 139 | männlich | 82 | pT1 G3 | negativ | negativ | positiv |
| 140 | männlich | 81 | pT1 G2 | positiv | positiv | positiv |
| 141 | männlich | 71 | pTa G2 | positiv | n.a. | n.a. |
| 142 | männlich | 69 | pTa G2 | positiv | positiv | positiv |
| 143 | männlich | 73 | pTa G2 | positiv | negativ | positiv |
| 144 | weiblich | 67 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |

Tabelle 32: Übersicht Untergruppe mFISH-Untersuchungen aus Urin und Tumormaterial; n.a. - nicht auswertbar

| Nr. | Geschlecht | Alter | Histologie | Zytologie | mFISH Urin | mFISH Tumormaterial |
|-----|------------|-------|------------|-------------|------------|---------------------|
| 2 | weiblich | 87 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 6 | weiblich | 77 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 16 | weiblich | 60 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 17 | männlich | 72 | pT2a G3 | verdächtig | positiv | positiv |
| 18 | männlich | 85 | pTa G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 19 | männlich | 85 | pTa G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 20 | männlich | 72 | pTa G1 | verdächtig | negativ | negativ |
| 21 | männlich | 75 | pTa G2 | n. a. | positiv | positiv |
| 23 | männlich | 71 | pT2a G3 | positiv | positiv | positiv |
| 26 | männlich | 71 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 39 | männlich | 79 | pTa G2 | verdächtig | positiv | positiv |
| 40 | männlich | 74 | pTa G1 | verdächtig | positiv | positiv |
| 41 | weiblich | 63 | pTa G1 | negativ | positiv | positiv |
| 42 | männlich | 78 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 43 | männlich | 72 | pT1 G2 | positiv | negativ | positiv |
| 48 | männlich | 89 | pT2a G1 | negativ | positiv | negativ |
| 50 | männlich | 80 | pTa G1 | positiv | positiv | positiv |
| 52 | männlich | 59 | pT1 G2 | negativ | negativ | negativ |
| 54 | männlich | 69 | pTa G1 | negativ | n. a. | positiv |
| 55 | männlich | 79 | pTa G2 | negativ | negativ | positiv |
| 56 | männlich | 68 | pT2a G3 | verdächtig | positiv | positiv |
| 57 | männlich | 73 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 58 | männlich | 75 | pTa G1 | zweifelhaft | negativ | negativ |
| 60 | weiblich | 57 | pT2a G2 | positiv | positiv | positiv |
| 63 | weiblich | 86 | pT1 G2 | verdächtig | negativ | positiv |
| 69 | weiblich | 77 | pTa G1 | positiv | negativ | positiv |
| 71 | männlich | 86 | pTa G1 | n. a. | negativ | positiv |
| 72 | männlich | 28 | pTa G1 | verdächtig | n. a. | negativ |
| 74 | männlich | 76 | pTa G2 | verdächtig | negativ | positiv |
| 76 | weiblich | 88 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 77 | männlich | 68 | pTa G1 | negativ | n. a. | positiv |
| 79 | männlich | 62 | pT1 G2 | positiv | positiv | positiv |
| 80 | männlich | 55 | pTa G1 | negativ | n. a. | positiv |
| 82 | männlich | 75 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 83 | männlich | 63 | pTa G1 | zweifelhaft | positiv | positiv |
| 85 | männlich | 76 | pT1 G2 | negativ | negativ | positiv |
| 86 | männlich | 60 | pTa G1 | negativ | n. a. | negativ |
| 88 | weiblich | 86 | pTa G1 | verdächtig | negativ | positiv |
| 89 | weiblich | 73 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 91 | männlich | 52 | pTa G1 | verdächtig | positiv | negativ |
| 92 | männlich | 58 | pT1 G2 | zweifelhaft | positiv | negativ |
| 93 | männlich | 78 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 95 | männlich | 41 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 98 | weiblich | 81 | pT3b G3 | n. a. | positiv | positiv |
| 99 | männlich | 66 | pT3a G3 | n. a. | positiv | positiv |
| 102 | männlich | 60 | pTa G1 | negativ | negativ | negativ |
| 104 | männlich | 72 | pTa G1 | negativ | negativ | positiv |
| 105 | männlich | 61 | pTa G1 | negativ | n. a. | positiv |
| 106 | männlich | 57 | pTa G1 | negativ | n. a. | positiv |
| 107 | männlich | 41 | pT1 G2 | negativ | positiv | negativ |
| 109 | männlich | 76 | pT1 G3 | negativ | positiv | positiv |
| 110 | männlich | 73 | pTa G1 | negativ | positiv | positiv |

Tabelle 32 Fortsetzung: Übersicht Untergruppe mFISH-Untersuchungen aus Urin und Tumormaterial;
n.a. - nicht auswertbar

| | | | | | | | |
|-----|----------|----|------|----|-------------|---------|---------|
| 112 | männlich | 77 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 114 | männlich | 68 | pTa | G1 | negativ | negativ | positiv |
| 116 | männlich | 79 | pTa | G1 | negativ | negativ | positiv |
| 117 | männlich | 82 | pT2a | G3 | positiv | positiv | positiv |
| 118 | männlich | 62 | pT1 | G1 | zweifelhaft | negativ | positiv |
| 121 | männlich | 72 | pTa | G1 | negativ | negativ | positiv |
| 123 | männlich | 63 | pTa | G1 | positiv | positiv | positiv |
| 124 | männlich | 59 | pT1 | G1 | positiv | positiv | positiv |
| 125 | weiblich | 78 | pT1 | G1 | negativ | negativ | positiv |
| 126 | männlich | 76 | pT1 | G1 | positiv | positiv | positiv |
| 127 | männlich | 64 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 128 | weiblich | 62 | pTa | G2 | positiv | negativ | positiv |
| 129 | weiblich | 58 | pTa | G1 | negativ | negativ | negativ |
| 133 | weiblich | 78 | pTa | G1 | zweifelhaft | positiv | negativ |
| 134 | weiblich | 74 | pTa | G1 | positiv | positiv | positiv |
| 137 | männlich | 87 | pT2a | G3 | positiv | positiv | positiv |
| 138 | männlich | 64 | pTa | G2 | negativ | n. a. | negativ |
| 139 | männlich | 82 | pT1 | G3 | negativ | negativ | positiv |
| 142 | männlich | 69 | pTa | G2 | positiv | positiv | positiv |
| 143 | männlich | 73 | pTa | G2 | positiv | negativ | positiv |
| 144 | weiblich | 67 | pTa | G1 | negativ | negativ | positiv |

Tabellenverzeichnis:

| | Seite | |
|----|--|----|
| 1 | WHO Typisierung der Tumoren der Harnblase | 10 |
| 2 | Gegenüberstellung verschiedener Gradingssysteme urothelialer Tumoren | 11 |
| 3 | TNM-Klassifikation der Harnblasentumoren nach UICC 2002 | 12 |
| 4 | Beispiele urinbasierender nichtinvasiver Tumortestverfahren | 14 |
| 5 | Übersicht zum Management nicht muskelinvasiver Urothelkarzinome der Harnblase entsprechend der AWMF-Leitlinie zum Harnblasenkarzinom | 17 |
| 6 | Verteilung der histologischen Befunde (gesamtes Kollektiv) | 30 |
| 7 | Histologische Befunde in der Untergruppe des parallel untersuchten Tumorgewebes | 31 |
| 8 | Verwendete DNA-Sonden (UroVysion, Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA) | 34 |
| 9 | Verwendete Reagenzien und Materialien | 34 |
| 10 | Einteilung der untersuchten Zellkerne entsprechend der nachweisbaren Veränderungen | 37 |
| 11 | Befundinterpretation der mFISH | 38 |
| 12 | Ergebnisse der mFISH im gesamten Kollektiv | 40 |
| 13 | Sensitivität und Spezifität der mFISH nach „erweiterten Grenzwerten“ | 40 |
| 14 | Ergebnisse der mFISH-Untersuchung der Urinproben (Untergruppe: Urin / Tumormaterial) gegliedert nach lokaler Tumorausbreitung und nach Tumorigradung | 48 |
| 15 | Vergleich der mFISH-Untersuchungen aus Urin und Tumormaterial | 50 |
| 16 | Zytologie und mFISH der Fälle mit negativem mFISH-Befund des Tumormaterials bei positivem oder nicht auswertbarem mFISH-Urinbefund | 51 |
| 17 | Verlaufsdaten der Patienten mit positivem mFISH-Urinbefund und negativer Histologie | 51 |
| 18 | Literaturangaben zur Sensitivität und Spezifität der mFISH Untersuchungen des Urins | 53 |
| 19 | Literaturangaben zur Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie | 54 |

| | | |
|----|--|----|
| 20 | Gegenüberstellung der Sensitivität der mFISH-Urinuntersung (Gesamtkollektiv / Untergruppe parallel untersuchtes Tumormaterial), unterschieden nach Infiltrationstiefe | 59 |
| 21 | Gegenüberstellung der Sensitivität der mFISH-Urinuntersuchung (Gesamtkollektiv / Untergruppe parallel untersuchtes Tumormaterial), unterschieden nach Differenzierungsgrad | 60 |
| 22 | Vergleich der Sensitivität der mFISH im Tumormaterial und im Urin, unterschieden nach Infiltrationstiefe | 61 |
| 23 | Vergleich der Sensitivität der mFISH im Tumormaterial und im Urin, unterschieden nach Differenzierungsgrad | 61 |
| 24 | Urinzytologie (gesamtes Kollektiv) | 70 |
| 25 | Ergebnisse der mFISH-Urinuntersuchung gegliedert nach Ausdehnung des Primärtumors | 70 |
| 26 | Ergebnisse der mFISH-Urinuntersuchung gegliedert nach Grading | 70 |
| 27 | Urinzytologie (gesamtes Kollektiv) im Vergleich zum histologischen Befund der transurethralen Tumorsektion | 71 |
| 28 | Vergleich der Ergebnisse der Urinzytologie mit den Ergebnissen der mFISH-Untersuchung des Urins im Bezug auf den histologischen Befund der transurethralen Tumorsektion | 71 |
| 29 | Kombination von Urinzytologie und mFISH-Untersuchung des Urins gegliedert nach lokaler Tumorausbreitung und Grading | 72 |
| 30 | Ergebnis der mFISH-Untersuchung des Tumormaterials gegliedert nach Tiefeninfiltration und Tumorgrading | 72 |
| 31 | Übersicht aller untersuchten Fälle (Histologie, Urinzytologie und mFISH-Untersuchungen des Urins) | 73 |
| 32 | Übersicht Untergruppe mFISH-Untersuchungen aus Urin und Tumormaterial | 76 |

Abbildungsverzeichnis:

| | Seite |
|--|-------|
| 1 Endoskopischer Befund eines typischen papillären Harnblasentumors | 13 |
| 2 Mögliche Pfade der Entstehung von Urothelkarzinomen (modifiziert nach Knowles 2006) | 21 |
| 3 Prinzip der FISH (VYSIS UroVysion „Molekulare Zytologie zur Erkennung des Harnblasenkarzinoms“) | 33 |
| 4 Falschfarbenbild eines Zellkerns mit unauffälligem mFISH-Befund | 37 |
| 5 Falschfarbenbilder von Zellkernen mit einem auffälligem mFISH-Befund | 39 |
| 6 Ergebnis mFISH-Urinuntersuchung in Korrelation zur Ausdehnung des Primärtumors | 41 |
| 7 Ergebnis mFISH-Urinuntersuchung in Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors | 41 |
| 8 Ergebnisse der Urinzytologie des gesamten Kollektives | 42 |
| 9 Ergebnis Urinzytologie in Korrelation zur Tiefenausdehnung des Tumors | 43 |
| 10 Ergebnis Urinzytologie in Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors | 43 |
| 11 Gleichlautende mFISH- und Zytologiebefunde in Korrelation zur Infiltrationstiefe des Tumors | 45 |
| 12 Gleichlautende mFISH- und Zytologiebefunde in Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors | 46 |
| 13 Kombination der mFISH und der Urinzytologie in Korrelation zur Tiefenausdehnung und zum Differenzierungsgrad des Tumors | 47 |
| 14 mFISH des Tumormaterials in Korrelation zur Tiefenausdehnung und zum Differenzierungsgrad | 49 |
| 15 Gegenüberstellung der Verteilung der Infiltrationstiefe der Tumoren (Subgruppe mit paralleler mFISH-Untersuchung des Tumormaterials und Gesamtkollektiv der Fälle <i>mit</i> Tumornachweis) | 59 |
| 16 Gegenüberstellung der Verteilung des Differenzierungsgrades der Tumoren (Subgruppe mit paralleler mFISH-Untersuchung des Tumormaterials und Gesamtkollektiv der Fälle <i>mit</i> Tumornachweis) | 59 |

Quellenverzeichnis:

Aboukassim TO, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. **2003**. Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer. *Oncogene*, 22(19): 2967-2971.

Akkad T, Brunner A, Pallwein L, Gozzi C, Bartsch G, Mikuz G, Steiner H, Verdorfer I. **2007**. Fluorescence in situ hybridization for detecting upper urinary tract tumors--a preliminary report. *Urology*, 70(4): 753-757.

Ali-EI-Dein B, Sarhan O, Hinev A, Ibrahiem el-HI, Nabeeh A, Ghoneim MA. **2003**. Superficial bladder tumours: analysis of prognostic factors and construction of a predictive index. *BJU Int*, 92(4): 393-399.

Al-Sukhun S, Hussain M. 2003. Molecular biology of transitional cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 47(2): 181-193.

Anantharaman V, Aravind L. 2008. Analysis of DBC1 and its homologs suggests a potential mechanism for regulation of sirtuin domain deacetylases by NAD metabolites. *Cell Cycle*, 7(10): 1467-1472.

Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. **1999**. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer*, 80 (5-6): 904-908.

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J. **2008**. Guidelines on TaT1 (Non-muscle invasive) Bladder Cancer. European Association of Urology: <http://www.uroweb.org/professional-resources/guidelines/>.

Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Pairon JC, Jaurand MC, Thiery JP, Chopin DK, de Medina SG. **2003**. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 63(23): 8108-8112.

Bassi P, De Marco V, De Lisa A, Mancini M, Pinto F, Bertoloni R, Longo F. **2005**. Non-invasive diagnostic tests for bladder cancer: a review of the literature. *Urol Int*, 75(3): 193-200.

Bellmunt J, de Wit R, Albiol S, Tabernero J, Albanell J, Baselga J. **2003**. New drugs and new approaches in metastatic bladder cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 47(2): 195-206.

Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F. **2001**. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol*, 158(6): 1955-1959.

Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T, Pejavar S, Mehta K, Carroll P, Simko JP, Waldman FM. **2005**. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res*, 11(19 Pt 1): 7012-7022.

Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jöckel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P. **2000**. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*, 86(2): 289-294.

Brownson RC, Chang JC, Davis JR. **1987**. Occupation, smoking, and alcohol in the epidemiology of bladder cancer. *Am J Public Health*, 77(10): 1298-1300.

Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P. **2001**. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol*, 116(1): 79-86.

Busch C, Algaba F. 2002. The WHO/ISUP 1998 and WHO 1999 systems for malignancy grading of bladder cancer. Scientific foundation and translation to one another and previous systems. *Virchows Arch*, 441(2): 105-108.

Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. **1993**. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene*, 8(4): 1083-1085.

Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. **1991**. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, 6(12): 2305-2309.

Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH. **2000**. p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol*, 2(3): 148-155.

Chapman EJ, Harnden P, Chambers P, Johnston C, Knowles MA. **2005**. Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clin Cancer Res*, 11(16): 5740-5747.

Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, Young L, Shi SR, Gee C, Groshen S, Skinner DG, Cote RJ. **2004**. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 22(6): 1007-1013.

Chen AA, Grasso M. 2008. Is there a role for FISH in the management and surveillance of patients with upper tract transitional-cell carcinoma?. *J Endourol*, 22(6): 1371-1374.

Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL, Liu HS. **2001**. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res*, 7(7): 1957-1962.

Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, Proctor AJ, Eydmann ME, Parkinson C, Knowles MA. **1991**. Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer*, 63(4): 601-608.

Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE. **1992**. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 84(16): 1251-1256.

Deutsche Krebsgesellschaft. **2002**. Harnblasenkarzinom. In: *Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinie 2002*. Dritte Auflage

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, Hrsg. **2004**. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press, 90.

Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. **1994**. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*, 331(19): 1259-1264.

Esrig D, Spruck CH 3rd, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. **1993**. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*, 143(5): 1389-1397.

Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, Edwards S, Flohr P, Falconer A, Roe T, Kovacs G, Dennis N, Fisher C, Wooster R, Huddart R, Foster CS, Cooper CS. **2004**. Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene*, 23(8):1627-1630.

Filbeck T, Pichlmeier U, Knüchel R, Wieland WF, Rößler W. **2003**. Senkung des Rezidivrisikos oberflächlicher Harnblasenkarzinome mittels 5-Aminolävulinsäure-induzierter Fluoreszenzdiagnostik Resultate einer 5-Jahres-Studie. *Urologe A*, 42(10): 1366-1373.

Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M. **1992**. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res*, 52(6): 1393-1398.

Gardiner RA, Samaratunga ML, Walsh MD, Seymour GJ, Lavin MF. **1992**. An immunohistological demonstration of c-erbB-2 oncoprotein expression in primary urothelial bladder cancer. *Urol Res*, 20(2): 117-120.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut, Hrsg. 2006. Krebs in Deutschland. Fünfte Ausgabe, Saarbrücken, 80-83.

Glatz K, Willi N, Glatz D, Barascud A, Grilli B, Herzog M, Dalquen P, Feichter G, Gasser TC, Sulser T, Bubendorf L. 2006. An International Telecytologic Quiz on Urinary Cytology Reveals Educational Deficits and Absence of a Commonly Used Classification System. *Am J Clin Pathol*, 126(2): 294-301.

Gonzalez-Zulueta M, Ruppert JM, Tokino K, Tsai YC, Spruck CH 3rd, Miyao N, Nichols PW, Hermann GG, Horn T, Steven K, Summerhayes IC, Sidransky D, Jones PA. 1993. Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res*, 53(23): 5620-5623.

Groeneveld AE, Marszalek WW, Heyns CF. 1996. Bladder cancer in various population groups in the greater Durban area of KwaZulu-Natal, South Africa. *Br J Urol*, 78(2): 205–208.

Habuchi T, Devlin J, Elder PA, Knowles MA. 1995. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene*, 11(8): 1671-1674.

Habuchi T, Kinoshita H, Yamada H, Kakehi Y, Ogawa O, Wu WJ, Takahashi R, Sugiyama T, Yoshida O. 1994. Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst*, 86(17): 1331-1335.

Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles MA. 1998. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32–q33. *Genomics*, 48(3): 277-288.

Habuchi T, Takahashi R, Yamada H, Ogawa O, Kakehi Y, Ogura K, Hamazaki S, Toguchida J, Ishizaki K, Fujita J, Sugiyama T, Yoshida O. 1993. Influence of cigarette smoking and schistosomiasis on p53 gene mutation in urothelial cancer. *Cancer Res*, 53(16): 3795-3799.

Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S, Akao T, Sato K, Ogawa O, Knowles MA, Kato T. 2001. Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene*, 20(4): 531–537.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.

Hopman AH, Kamps MA, Speel EJ, Schapers RF, Sauter G, Ramaekers FC. 2002. Identification of chromosome 9 alterations and p53 accumulation in isolated carcinoma in situ of the urinary bladder versus carcinoma in situ associated with carcinoma. *Am J Pathol*, 161(4): 1119-1125.

Hornigold N, Devlin J, Davies AM, Aveyard JS, Habuchi T, Knowles MA. **1999**. Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. *Oncogene*, 18(16): 2657-2661.

Hovey RM, Chu L, Balazs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR, Waldman FM. **1998**. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res*, 58(16): 3555-3560.

Hungerhuber E, Stepp H, Kriegmair M, Stief C, Hofstetter A, Hartmann A, Knuechel R, Karl A, Tritschler S, Zaak D. **2007**. Seven Years' Experience with 5-Aminolevulinic Acid in Detection of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Urology*, 69(2): 260- 264.

Hurst CD, Fiegler H, Carr P, Williams S, Carter NP, Knowles MA. **2004**. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*, 23(12): 2250-2263.

Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA. **2005**. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, 24(33): 5218-5225.

Junker K, van Oers JM, Zwarthoff EC, Kania I, Schubert J, Hartmann A. **2008**. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder tumors correlate with low frequency of chromosome alterations. *Neoplasia*, 10(1): 1-7.

Kagan J, Liu J, Stein JD, Wagner SS, Babkowski R, Grossman BH, Katz RL. **1998**. Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer. *Oncogene*, 16(7): 909-913.

Kälble T. **2005**. Umweltfaktoren als wesentliche Ursache des Blasenkarzinoms und seiner Epidemiologie – Ein historischer Überblick. In: Lehmann J, Retz M, Stöckle M, Hrsg. *Blasenkarzinom*. Erste Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 17-26

Kassen A, Hofmockel G. **2000**. Molekulargenetische und zellbiologische Grundlagen der Entstehung von malignen Tumoren. *Urologe A*, 39(3): 214-221

Knowles MA. **1999**. The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int*, 84(4): 412-427

Knowles MA. **2006**. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?. *Carcinogenesis*, 27(3): 361-373.

Knowles MA, Habuchi T, Kennedy W, Cuthbert-Heavens D. **2003**. Mutation spectrum of the 9q34 tuberous sclerosis gene TSC1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 63(22): 7652-7656.

Koed K, Wiuf C, Christensen LL, Wikman FP, Zieger K, Moller K, von der Maase H, Orntoft TF. **2005**. High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors. *Cancer Res*, 65(1): 34-45.

Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG. **2001**. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res*, 61(18): 6688-6692.

Linnenbach AJ, Pressler LB, Seng BA, Simmel BS, Tomaszewski JE, Malkowicz SB. **1993**. Characterization of chromosome 9 deletions in transitional cell carcinoma by microsatellite assay. *Hum Mol Genet*, 2(9): 1407-1411.

Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY., Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF. **1992**. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 84(16): 1256-1261.

Lotan Y, Roehrborn CG. **2003**. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology*, 61(1): 109-118

Louhelainen J, Wijkstrom H, Hemminki K. **2000**. Initiation-development modelling of allelic losses on chromosome 9 in multifocal bladder cancer. *Eur J Cancer*, 36(11): 1441-1451.

Louie-Johnsun MW, Braslis KG, Murphy DL, Neerhut GJ, Grills RJ. **2007**. Radical cystectomy for primary bladder malignancy: a 10 year review. *ANZ J Surg*, 77(4): 265-269.

Manning BD, Cantley LC. **2003**. United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase / Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 3): 573-578.

Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmoller J, Ishizaki T, Karakaya AE, Ladero JM, Mommsen S, Okkels H, Romkes M, Roots I, Rothman N. **2000**. Cigarette Smoking, N-Acetyltransferase 2 Acetylation Status, and Bladder Cancer Risk: A Case-Series Meta-analysis of a Gene-Environment Interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(5): 461-467.

Marín-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, Musquera M, Ars E, Villavicencio H, Algaba F, Alcaraz A. **2007**. Utility of fluorescence in situ hybridization as a non-invasive technique in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Eur Urol*, 51(2): 409-415.

McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Malkowicz SB. **1998**. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene*, 17(9): 1167-1172.

Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. **2006**. Molecular Pathways in Invasive Bladder Cancer: New Insights Into Mechanisms, Progression and Target Identification. *J Clin Oncol*, 24(35): 5552-5564.

Moonen PMJ, Merckx GF, Peelen P, Karthaus HF, Smeets DF, Witjes JA. **2007**. UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 51(5): 1275-1280

Neal DE, Sharples L, Smith K, Fennelly J, Hall RR, Harris AL. **1990**. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 65(7): 1619-1625.

Nishiyama H, Gill JH, Pitt E, Kennedy W, Knowles MA. **2001**. Negative regulation of G(1)/S transition by the candidate bladder tumour suppressor gene DBCCR1. *Oncogene*, 20(23): 2956-2964.

Nishiyama H, Takahashi T, Kakehi Y, Habuchi T, Knowles MA. **1999**. Homozygous deletion at the 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in primary human bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 26(2): 171-175.

Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, Gasser T, Mihatsch MJ, Sauter G. **2004**. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene*, 23(33): 5616-5623.

Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C. **2002**. Guidelines on Bladder Cancer. *Eur Urol*, 41(2): 105-112

Ornitz DM, Itoh N. **2001**. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, 2(3): reviews3005.1-3005.12.

Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. **2002**. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*, 10(6): 311-322.

Pfister C, Moore L, Allard P, Larue H, Lacombe L, Têtu B, Meyer F, Fradet Y. **1999**. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin Cancer Res*, 5(12): 4079-4084.

Placer J, Espinet B, Salido M, Solé F, Gelabert-Mas A. **2002**. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur Urol*, 42(6): 547-552.

Rathert P. **2003**. Urinzytologie beim Harnblasenkarzinom. *Urologe A*, 42(7): 908-911

Retz M, Lehmann J. **2005**. Molekulare Prognosemarker des Harnblasenkarzinoms. In: Lehmann J, Retz M, Stöckle M, Hrsg. *Blasenkarzinom*. Erste Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 27-65.

Richter J, Wagner U, Schraml P, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G. **1999**. Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Res*, 59(22): 5687-5691.

Riesz P, Lotz G, Páska C, Szendrői A, Majoros A, Németh Z, Törzsök P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Z, Romics I, Kiss A. **2007**. Detection of Bladder Cancer from the Urine using Fluorescence in situ Hybridization Technique. *Pathol Oncol Res*, 13(3): 187-194.

Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg MP, Sidransky D. **1995**. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res*, 55(22): 5213-5216.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. **1994**. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol*, 152(2 Pt 1): 388-392.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. **1993**. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*, 85(1): 53-59.

Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge JA, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, Soloway M, Flom K. **2002**. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol*, 168(5): 1950-1954.

Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F. **1993**. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res*, 53(10 Suppl): 2199-2203.

Schmitz-Dräger BJ, Goebell PJ, Ebert T, Fradet Y. **2000**. p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer. Playground for urology scientists?. *Eur Urol*, 38(6): 691-699.

Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA, Jürgens B, Gerharz CD, van Roeyen CR, Büttel H, Ebert T, Ackermann R. **1997**. c-myc in bladder cancer. Clinical findings and analysis of mechanism. *Urol Res*, 25(Suppl 1): S45-S49.

Schroeder GL, Lorenzo-Gomez MF, Hautmann SH, Friedrich MG, Ekici S, Huland H, Lokeshwar V. **2004**. A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *J Urol*, 172(3): 1123-1126.

Schwarz S, Rechenmacher M, Lottner C, Brockhoff G, Hartmann A, Langer S, Knüchel R. **2004**. FISH-Untersuchungen an Multi-Tissue-Arrays zur Differenzierung flacher Läsionen des Urothels. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 88: 184-193.

Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF, Lerner SP. **2004**. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol*, 22(6): 1014-1024.

Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B. **1991**. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 252(5006): 706-709

Simon MA, Lokeshwar VB, Soloway MS. **2003**. Current bladder cancer tests: unnecessary or beneficial?. *Crit Rev Oncol Hematol*, 47(2): 91-107.

Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y. **1999**. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene*, 18(1): 157-163.

Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, Procop GW, Jones JS, Ulchaker J, Zippe CD, Tubbs RR. **2003**. 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*, 169(6): 2101-2105.

Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. **2000**. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn*, 2(3): 116-123.

Spruck CH 3rd, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmütte C, Yang AS, Cote R, Dubeau L, Nichols PW, Hermann GG, Steven K, Horn T, Skinner DG, Jones PA. **1994**. Two Molecular Pathways to Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer Res*, 54(3): 784-788

Spruck CH 3rd, Rideout WM 3rd, Olumi AF, Ohneseit PF, Yang AS, Tsai YC, Nichols PW, Horn T, Hermann GG, Steven K, Ross RK, Yu MC, Jones PA. **1993**. Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res*, 53(5): 1162-1166.

Stadler WM, Steinberg G, Yang X, Hagos F, Turner C, Olopade OI. **2001**. Alterations of the 9p21 and 9q33 chromosomal bands in clinical bladder cancer specimens by fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res*, 7(6): 1676-1682.

Stein JP, Skinner DG. 2003. Results with radical cystectomy for treating bladder cancer: a 'reference standard' for high-grade, invasive bladder cancer. *BJU Int*, 92(1): 12-17.

Stenzl A, Jocham D, Jichlinski P, Junker K, König F, van den Bergh H, Volkmer B, Zaak D, Gschwend JE; Working Group for Oncology of the German Society for Urology. **2008**. Photodynamische Diagnostik im Harntrakt. Konsensusempfehlungen des Arbeitskreises Onkologie der Deutschen Gesellschaft für Urologie. *Urologe A*, 47(8): 982-987.

Störkel S. 2005. Typing, Grading und Staging beim Harnblasenkarzinom: Pathomorphologische Parameter und deren Bedeutung für die Klinik. In: Lehmann J, Retz M, Stöckle M, Hrsg. *Blasenkarzinom*. Erste Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 1-10.

Theodorescu D, Cornil I, Fernandez BJ, Kerbel RS. **1990**. Overexpression of normal and mutated forms of HRAS induces orthotopic bladder invasion in a human transitional cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(22): 9047-9051.

Theodorescu D, Cornil I, Sheehan C, Man MS, Kerbel RS. **1991**. Ha-ras induction of the invasive phenotype results in up-regulation of epidermal growth factor receptors and altered responsiveness to epidermal growth factor in human papillary transitional cell carcinoma cells. *Cancer Res*, 51(16): 4486-4491.

Thériault G, Tremblay C, Cordier S, Gingras S. **1984**. Bladder cancer in the aluminium industry. *Lancet*, 1(8383): 947-950.

Thomas JE, Bassett MT, Sigola LB, Taylor P. **1990**. Relationship between bladder cancer incidence, *Schistosoma haematobium* infection, and geographical region in Zimbabwe. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(4): 551-553.

Tricker AR, Mostafa MH, Spiegelhalter B, Preussmann R. **1989**. Urinary excretion of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in Schistosomiasis and bilharzia bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, 10(3): 547-552.

Tritschler S, Zaak D, Knuechel R, Stief CG. **2006**. Urinzytologie und Urinmarker Bedeutung für die Praxis. *Urologe A* 45(11): 1441-1448.

Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. **1990**. Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*, 50(1): 44-47.

Tuna B, Yörükoğlu K, Tüzel E, Güray M, Mungan U, Kirkali Z. **2003**. Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer. *Pathol Res Pract*, 199(5): 323-328.

van Rhijn BW, Montironi R, Zwarthoff EC, Jobsis AC, van der Kwast TH. **2002**. Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. *J Pathol*, 198(2): 245-251.

van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boeve ER, Jobsis AC, Zwarthoff EC. **2004**. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res*, 64(6): 1911-1914.

van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. **2005**. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 47(6): 736-748.

van Tilborg AA, de Vries A, de Bont M, Groenfeld LE., van der Kwast TH, Zwarthoff EC. **2000**. Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder. *Hum Mol Genet*, 9(20): 2973-2980.

Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN, Waldman FM. **2003**. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res*, 63(11): 2872-2880.

Vysis Inc. **2002**. Vysis® UroVysion Test für den Nachweis des Blasenkarzinom-Rezidivs (CEP® 3 SpectrumRed™, CEP 7 SpectrumGreen™, CEP 17 SpectrumAqua™, und LSI® 9p21 SpectrumGold™) [Packungsbeilage]. Downers Grove Illinois: Vysis Inc.

Wawroschek F, Roth S. **2003**. Hämaturie beim Harnblasenkarzinom. *Urologe A* 42(7): 902-907.

Williamson MP, Elder PA, Knowles MA. **1994**. The spectrum of TP53 mutations in bladder carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 9(2): 108-118.

Wright KO, Messing EM, Reeder JE. **2004**. DBCCR1 mediates death in cultured bladder tumor cells. *Oncogene*, 23(1): 82-90.

Xu HJ, Cairns P, Hu SX, Knowles MA, Benedict WF. **1993**. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer*, 53(5): 781-784.

Yamaguchi N, Watanabe S, Okubo T, Takahashi K. **1991**. Work-related bladder cancer risks in male Japanese workers: estimation of attributable fraction and geographical correlation analysis. *Jpn J Cancer Res*, 82(6): 624-631.

Zellweger T, Benz G, Cathomas G, Mihatsch MJ, Sulser T, Gasser TC, Bubendorf L. **2006**. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer*, 119(7): 1660-1665.

Zhang ZT, Pak J, Huang HY, Shapiro E, Sun TT, Pellicer A, Wu XR. **2001**. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene*, 20(16): 1973-1980.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tobias Fritsch

Wohnort:
07743 Jena

Geburtsdatum: 10.02.1975

Geburtsort: Jena

Familienstand: verheiratet, drei Kinder

Schulbildung:

09.1981 – 02.1986 Polytechnische Oberschule „Erwin Panndorf“ in Gera

02.1986 – 08.1990 Oberschule „M. W. Frunse“ in Halle (Saale)

09.1990 – 06.1993 „Adolf Reichwein Gymnasium“ in Halle (Saale)

Abschluss mit dem Abitur

Zivildienst:

10.1993 – 12.1994 Kliniken der Martin-Luther-Universität Halle

Hochschulstudium:

08.1995 – 09.1998 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle

10.1998 – 11.2001 Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Berufliche Tätigkeit:

01.2002 – 06.2003 Arzt im Praktikum in der Klinik für Urologie der FSU Jena

07.2003 – Assistenzarzt in der Klinik für Urologie des UKJ (Jena)

10.2007 Facharztanerkennung Urologie

Jena, den 16.01.2009

Danksagung:

Ich möchte mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zur Entstehung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Frau PD Dr. med. habil. Kerstin Junker, der Leiterin des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena, für die Überlassung des Themas, die umfassende und außerordentlich engagierte Betreuung bei den experimentellen Arbeiten sowie für die Beratung bei der Erstellung des Manuskriptes.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. h.c. Jörg Schubert, Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena, für die umfangreiche Unterstützung, die Schaffung optimaler Bedingungen zur Bearbeitung des Themas sowie für die geduldigen Ermutigungen in allen Phasen der Arbeit und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. habil. Thomas Steiner für die wertvollen Hinweise bei der Erstellung der Arbeit und die Durchsicht des Manuskriptes.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena danke ich für die freundliche Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten.

Und natürlich gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meiner Ehefrau Susanne für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

PD Dr. med. habil. Kerstin Junker,

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schubert,

PD Dr. med. habil. Thomas Steiner,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 16.01.2009