

# Invasionsmechanismen und Metastasierung des Urothelkarzinoms

# Allgemeines

- Hauptursachen der krebsspezifischen Mortalität sind Tumorinvasion und Metastasierung.
- Beim Urothelkarzinom existieren histopathologische und molekulare Parameter, die mit aggressivem Tumorwachstum und Metastasierung korrelieren.

# Epidemiologie

- Das Urothelkarzinom der Blase zählt zu den häufigsten Malignomen des Mannes.
- Nur 5% manifestieren sich im oberen Harntrakt.

# Klassifikation

- Nicht invasive Karzinome (pTa)
- Invasive Karzinome
  - „durchbrechen“ die Basalmembran >>> pT1
  - zeigen eine high-grade Differenzierung
  - besitzen Metastasierungspotenzial
  - pT2
  - pT3
  - pT4
- Bei 25% der Erstdiagnosen liegt bereits ein muskelinvasives Wachstum vor.

# Therapie der Wahl beim invasiven Urothelkarzinom

- Radikale Zystoprostatektomie (RZ) mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie
  - 5-Jahre-Überlebenszeit 50-60%.
- Eine **lymphogene Metastasierung** ist zum Zeitpunkt der RZ ein negativer Prognosefaktor,
  - erfolgt in der Regel **vor** der Diagnose hämatogener Fernmetastasen.

# Allgemeine Mechanismen der Metastasierung

- Lokale Invasion und spätere Metastasierung sind ein **kaskadenartiger Prozess** beginnend mit
  - lokaler Migration des Tumors >>
  - dann Invasion durch Separation vom Primärtumor >>
  - Durchbrechen der Basalmembran und Invasion des lokalen Stromas bzw. der extrazellulären Matrix (EZM) >>
  - Invasion in Lymph- und/oder Blutgefäße.
- **Cave: Tumorzellen können die Zirkulation wieder verlassen, in umliegendes Gewebe eindringen und ihr eigenes Stroma bilden.**
- **Folge: Kolonisierung und Fernmetastasenbildung.**

# Metastasierung durch Migration von Tumorzellen durch funktionell getrennte Kompartimente

- **Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM) durch**
  - Integrine
  - Matrixmetalloproteinasen (MMP)
- **Folge:**
  - Lyse der ECM
  - Hemmung der Zell-Zell-Interaktionen
  - Hemmung der Zelladhäsion

# Metastasierung durch Migration von Tumorzellen durch funktionell getrennte Kompartimente

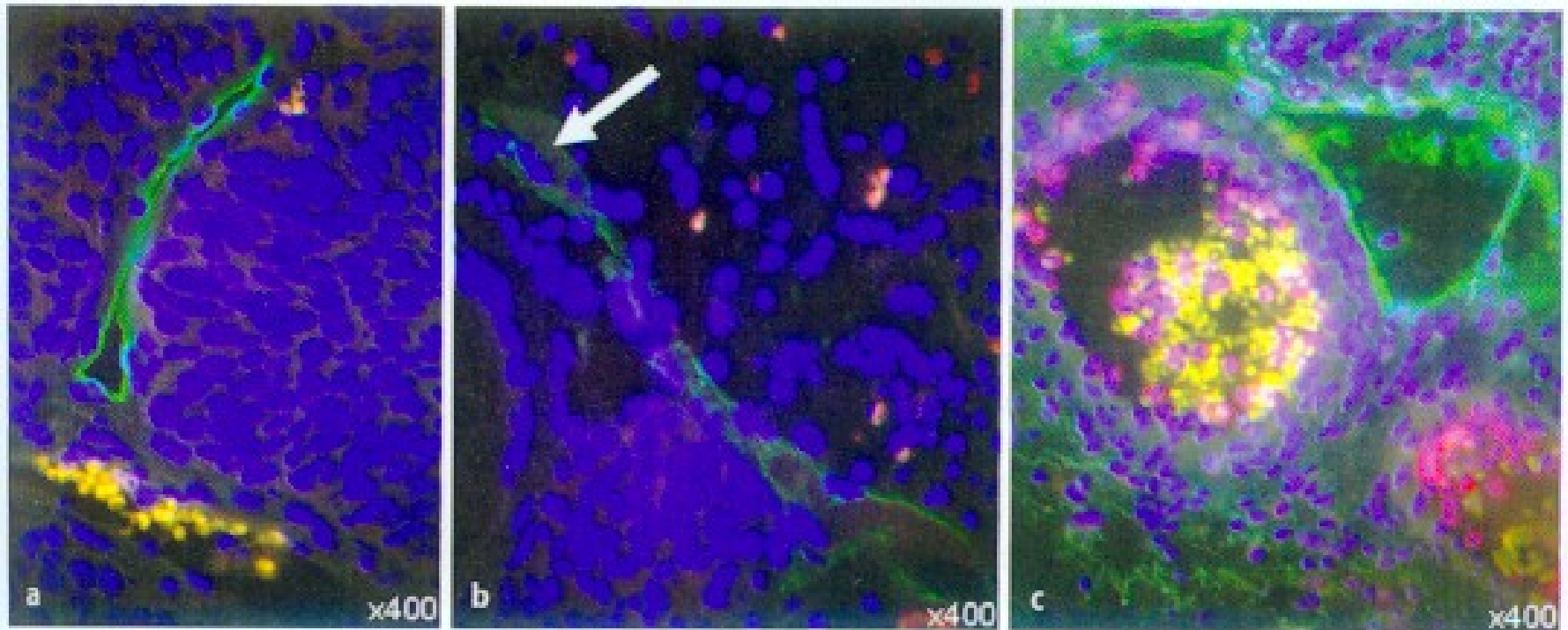
- **Matrixmetalloproteinasen (MMP)**
  - sind eine Gruppe zinkabhängiger Endopeptidasen
- nehmen Einfluss auf
  - Proliferation
  - Angiogenese
  - Migration
  - Invasion
  - Metastasierung



- **Epitheliale mesenchymale Transition (EMT)**, ein weiterer Invasionsmechanismus
  - Tumorzellen verändern ihren ursprünglichen Phänotyp z.B. durch Verlust ihrer epithelialen Merkmale:
  - Verlust von **(E-) Cadherin**, ein Protein zur Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte.
  - verstärkte Expression von **N-Cadherin**, welches mesenchymale Zellen kennzeichnet.
- Der „**Cadherin-Switch**“ führt zu einer erhöhten Zellmotilität.
- **Interaktion zwischen Gefäß-, Tumor- und Endothelzellen = Endothelzellaktivierung**
- ist relevant für spätere Extravasation
  - Kontakt führt zu einem
    - prothrombotischen
    - proinflammatorischen
    - die Zelladhäsion begünstigenden intravaskulären Milieu.

# Bedeutung des Lymphgefäßsystems für die Metastasierung

- Aus der Tumorperipherie erfolgt die lymphogene Metastasierung = Zellinvasion der Lymphgefäße
- >> Lymphgefäßdilatation durch hyperpermeable Blutgefäße
- >> erhöhter interstitieller Druck
- >> Lymphstau
  
- **Cave: Einige Mechanismen gleichen Prozessen der Wundheilung**
  - bei Entzündungen
  - der Angiogenese
  - der Lymphangiogenese
  - der Chemotaxis immunologischer Zellen



**Abb. 1** ▲ Immunfluoreszenzfärbung von Lymphgefäßen mit dem Marker D2–40 (Podoplanin), der das Endothel von Lymphgefäßen spezifisch anfärbt [grün markiert mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)]. Die Tumorzellkerne sind jeweils mittels 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) blau angefärbt. Aufgrund multipler Eigenfluoreszenzeffekte werden innerhalb von Blutgefäßen u. a. Erythrozyten sichtbar (eigene Färbungen; Vergrößerung 400:1). **a** Intratumorales kollabiertes Lymphgefäß. Die Kompression des Lymphgefäßes wird durch einen erhöhten interstitiellen Druck innerhalb des soliden Tumorareals verursacht. **b** Intratumorales Lymphgefäß. Es wird ein Tumorzellkern innerhalb des Endothellumens sichtbar (weißer Pfeil), möglicherweise einer lymphovaskulären Invasion entsprechend. **c** Lymphgefäß in der Tumorperipherie, das typischerweise parallel zu Blutgefäßen lokalisiert ist und ein weites Lumen besitzt

# Lymphgefäßspezifische Marker

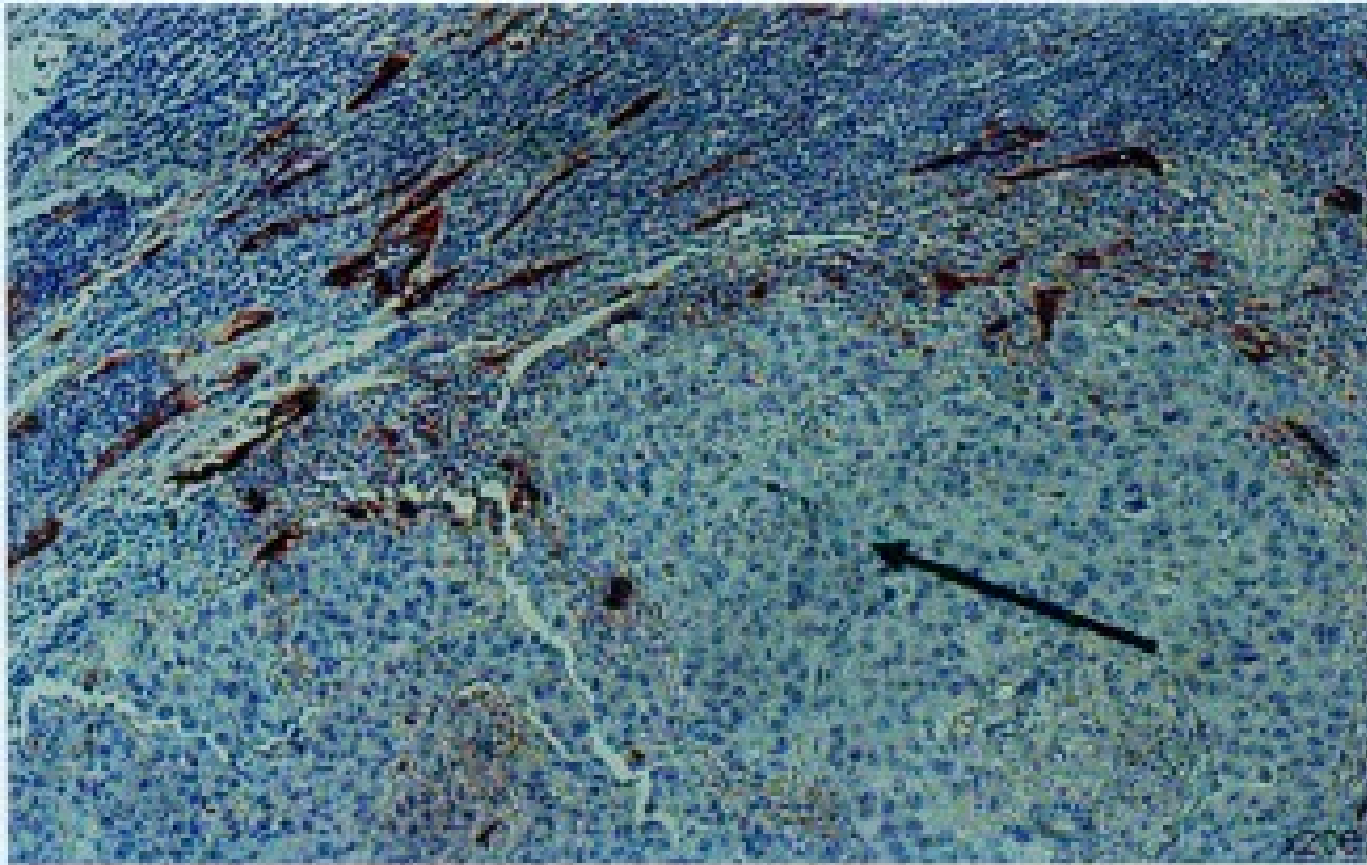
Folgende Marker korrelieren mit der Entwicklung eines neuen tumorassoziierten Lymphgefäßsystems:

- Lyve-1
- Podoplanin
- VEGF-C
- VEGF-D

# Mechanismen der Metastasierung des Urothelkarzinoms

- Degradation der ECM und der Basalmembran
- >> Beginn der Invasion
  
- Die Hauptbestandteile der urothelischen Basalmembran
  - Laminin
  - Typ IV-Kollagenwerden von MMP2 und MMP9 (= Gelatinasen) gespalten.
- >> erhöhte Sekretion von MMP2 und MMP9 beim muskelinvasiven Urothelkarzinom

- Patienten, die kein **N-Cadherin** exprimieren haben eine schlechtere Prognose als mit **N-Cadherin**.
- Die verstärkte Expression von **Chemokinen** ist
  - physiologisch bei Immunreaktionen und Entzündungen
  - pathologisch bei Urothelkarzinomen.  
machen Chemotaxis
  - >> erhöhter Zellmotilität >> Invasion >> Kolonisierung  
>> Metastasen.
- **VEGF und Chemokine** induzieren
  - Angio- und Lymphangiogenese.



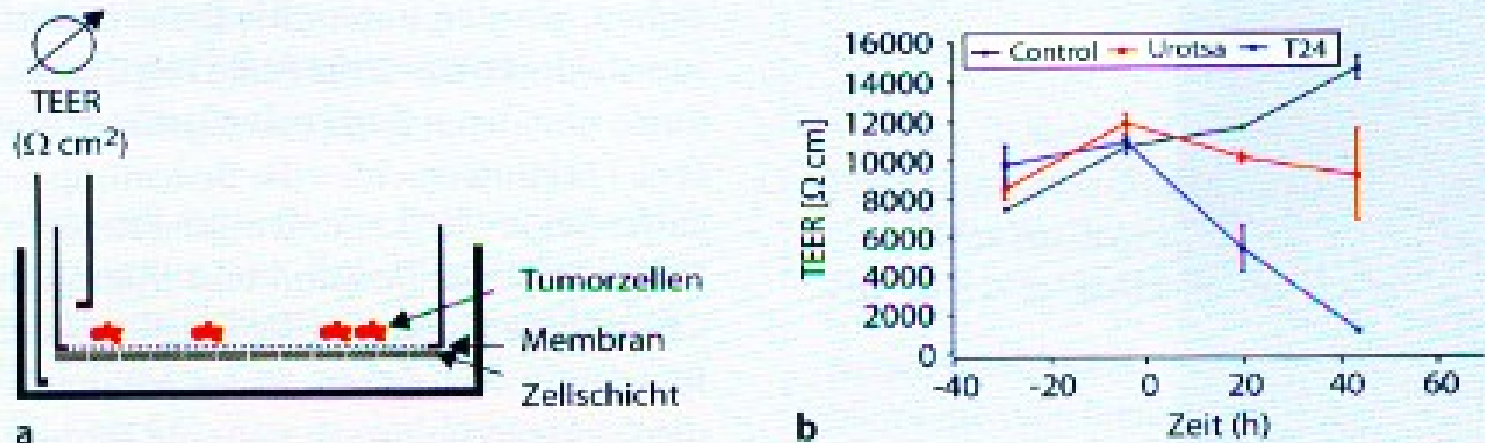
**Abb. 2 ▲** Erhöhte Lymphgefäßdichte (Lymphgefäßendothelzellen *dunkelrot* angefärbt mit D2-40) in der Peripherie eines Tumorareals (*schwarzer Pfeil*). Beim Urothelkarzinom der Harnblase und des oberen Harntraktes wurde jeweils eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten peritumoralen Lymphgefäßdichte und dem Vorhandensein einer Lymphknotenmetastasierung beobachtet (eigene Färbung; Vergr. 200:1)

# Ein neuer elektrophysiologischer Invasionsassay

- basiert auf dem **Abfall eines elektrischen Widerstandes** über einer Einzelschicht von Zellen, die die Basalmembran simuliert.
  - Durch Lösung der Zellverbände in der Einzelzellschicht kommt es zu einem Widerstandsabfall.
  - Dies geschieht durch proteolytische Enzyme, die durch die Urothelkarzinomzellen induziert werden.
  - **Die Höhe des Widerstandsabfalles ist proportional dem Invasionspotential der Karzinomzelle.**
- Dies ermöglicht es, **benigne von malignen Zellen eindeutig zu unterscheiden.**



# Neuer elektrophysiologischer Invasionsassay



**Abb. 3** ▲ **a** Schematischer Aufbau des neuen elektrophysiologischen Invasionsassays. Epitheliale MDCK-C7-Zellen („Zellschicht“) werden unter einer Membran ausgesät (Porengröße innerhalb der Membran  $0,4 \mu\text{m}$ ). Es werden Urothelkarzinomzellen („Tumorzellen“) in die Einsatzschale gesät. Diese befindet sich oberhalb der Membran. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wird in ca. 24-stündlichen Intervallen anhand eines Volt-Ohm-Meters gemessen und korreliert mit dem invasiven Potential der Tumorzellen. **b** Reproduzierbare Widerstandsabfälle zeigten sich in unabhängigen Messungen über einen Zeitraum von 4 Tagen. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Invasionspotential benigner Urothel- (Urotsa, rote Kurve) und Urothelkarzinomzellen (T24, blaue Kurve; hoher TEER-Abfall = hohes invasives Potential) beobachtet (mod. nach [3] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

# Ausblick

- Wenn die Schlüsselmechanismen der Invasion identifiziert sind, wäre eine molekular zielgerichtete lokale Instillationstherapie der Harnblase denkbar.
- Durch einen Widerstandstest wäre eine eindeutige Differenzierung von benignen und malignen Urothelzellen möglich.

## Literatur

1. Bolenz C, Auer M, Strobel P et al (2012) The lymphatic system in clinically localized urothelial carcinoma of the bladder: morphologic characteristics and predictive value. *Urol Oncol*. doi:10.1016/j.urolonc.2012.02.012 (Epub ahead of print)
2. Bolenz C, Fernandez MI, Trojan L et al (2009) Lymphangiogenesis occurs in upper tract urothelial carcinoma and correlates with lymphatic tumour dissemination and poor prognosis. *BJU Int* 103:1040–1046
3. Bolenz C, Gorzelanny C, Knauf D et al (2013) Assessing the invasive potential of bladder cancer: development and validation of a new preclinical assay. *J Urol* 189:1939–1944
4. Bolenz C, Herrmann E, Bastian PJ et al (2010) Lymphovascular invasion is an independent predictor of oncological outcomes in patients with lymph node-negative urothelial bladder cancer treated by radical cystectomy: a multicentre validation trial. *BJU Int* 106:493–499
5. Bolenz C, Lotan Y (2008) Molecular biomarkers for urothelial carcinoma of the bladder: challenges in clinical use. *Nat Clin Pract Urol* 5:676–685
6. Bolenz C, Shariat SF, Edwards T et al (2009) Expression of multiple biomarkers is associated with locally advanced urothelial carcinoma of the bladder in a prospective evaluation. *J Urol* 181:374
7. Christofori G (2006) New signals from the invasive front. *Nature* 441:444–450
8. Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161–174
9. Fernandez MI, Bolenz C, Trojan L et al (2008) Prognostic implications of lymphangiogenesis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 53:571–578
10. Fidler IJ (2002) Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 12:89–96
11. Goerge T, Barg A, Schnaeker EM et al (2006) Tumor-derived matrix metalloproteinase-1 targets endothelial proteinase-activated receptor 1 promoting endothelial cell activation. *Cancer Res* 66:7766–7774
12. Herrmann E, Eltze E, Kopke T et al (2007) New markers for pharmacological targeting in bladder cancer with lymph node metastasis. *Aktuelle Urol* 38:392–397
13. Jager T, Becker M, Eisenhardt A et al (2010) The prognostic value of cadherin switch in bladder cancer. *Oncol Rep* 23:1125–1132
14. Jemal A, Bray F, Center MM et al (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69–90
15. Karpanen T, Alitalo K (2008) Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Ann Rev Pathol* 3:367–397
16. Kesler CT, Liao S, Munn LL et al (2013) Lymphatic vessels in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5:111–124
17. Knauf D, Gorzelanny C, Schneider SW et al (2012) Invasive growth of urothelial carcinoma of the bladder: functional role of matrix metalloproteinases-2, -7 and -9. *Urologe* 51:126
18. Lotan Y, Gupta A, Shariat SF et al (2005) Lymphovascular invasion is independently associated with overall survival, cause-specific survival, and local and distant recurrence in patients with negative lymph nodes at radical cystectomy. *J Clin Oncol* 23:6533–6539
19. Ludwig T, Ossig R, Graessel S et al (2002) The electrical resistance breakdown assay determines the role of proteinases in tumor cell invasion. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:319–327
20. Margulis V, Lotan Y, Montorsi F et al (2008) Predicting survival after radical cystectomy for bladder cancer. *BJU Int* 102:15–22
21. Martini T, Von Hardenberg J, Knauer A et al (2012) Expression der lymphspezifischen Marker VEGF-D, Flt-4, VEGF-C und CCR7 beim Urothelkarzinom der Harnblase. Assoziation mit histopathologischen Parametern und klinischem Verlauf. *Urologe* 51:80
22. Misumi T, Yamamoto Y, Miyachika Y et al (2012) DNA copy number aberrations associated with lymphovascular invasion in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer Genet* 205:313–318
23. Nisato RE, Tille JC, Pepper MS (2003) Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Thromb Haemost* 90:591–597
24. Retz MM, Sidhu SS, Blawer E et al (2005) CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Int J Cancer* 114:182–189
25. Shariat SF, Karakiewicz PI, Palapattu GS et al (2006) Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. *J Urol* 176:2414–2422 (discussion 2422)
26. Shariat SF, Youssef RF, Gupta A et al (2010) Association of angiogenesis related markers with bladder cancer outcomes and other molecular markers. *J Urol* 183:1744–1750
27. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R et al (2001) Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 19:666–675
28. Szarvas T, Vom Dorp F, Ergun S et al (2011) Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. *Nat Rev Urol* 8:241–254
29. Thiery JP, Acloque H, Huang RY et al (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871–890
30. Van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W (2011) Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 728:23–34