Molekulares Profiling und prädiktive Signaturen

Biomarkeranalysen beim Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom steht in der Häufigkeitsstatistik der Krebserkrankungen der Frau an achter Stelle, ist aber die fünfthäufigste krebserbezogene Todesursache. Ovarialkarzinome haben die höchste Mortalitätsrate aller Krebserkrankungen des weiblichen Genitaltrakts, die Fünfjahresüberlebensrate beträgt über alle Stadien nur 45%. Ein diagnostisches Problem beim Ovarialkarzinom liegt darin, dass 70% der Patientinnen mit fortgeschrittenen Tumoren diagnostiziert werden, die bereits intraperitoneal disseminiert sind.

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht aus einer ausgedehnten chirurgischen Entfernung aller Tumorknoten sowie einer adjuvanten Chemotherapie, üblicherweise mit Carboplatin und Paclitaxel. Dieses therapeutische Vorgehen führt zu recht hohen Primärremissionen. Dennoch kommt es bei 50–75% der Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung zu Rezidiven. Um die Prognose und den klinischen Verlauf der Erkrankung besser einschätzen zu können, sind Untersuchungen zu molekularen Markern not-

wendig, die im Tumorgewebe bestimmt werden.

Diese molekularen Marker können helfen, Patientinnen mit besonders schlechtem Ansprechen auf die Standardtherapie zu identifizieren. Diese Patientinnen können von intensivierten Therapieschemata mit neuen molekularen Therapeutika profitieren.

Biomarker im Tumorgewebe sollten standardisiert und zuverlässig bestimmbar sein und Informationen über den molekularen Zustand des Tumors liefern. Wichtig ist dabei, dass Biomarker im Bereich von unterschiedlichen biologischen Ebenen bestimmt werden können. Die wichtigsten biologischen Ebenen sind in **Abb. 1** gezeigt, es handelt sich um wesentliche funktionelle Unter-einheiten der Zelle. Wie in **Abb. 1** gezeigt, kann es sich zum einen um Veränderungen der DNA, d. h. auf genomischer Ebene, handeln. Des Weiteren kommen Veränderungen des Transkriptom, d. h. der mRNA, infrage. Immunhistologische Biomarker untersuchen die 3. Ebene, die der Proteine.

Neben diesen 3 recht bekannten biologischen Ebenen gibt es noch die Ebene der

Metaboliten, d. h. der niedermolekularen Stoffwechselprodukte, die als Ergebnis der biochemischen Signalwege und der enzymatischen Reaktionen im Tumorgewebe entstehen. Diese molekularen Stoffwechselprodukte sind chemisch sehr heterogen. Sie können daher nicht wie z. B. Gene oder RNA-Moleküle durch einfaches Amplifizieren und Sequenzieren untersucht werden.

Eine umfassende Darstellung möglichst aller Metaboliten in einem biologischen System wird unter dem Begriff *Metabolomics* zusammengefasst. Wichtig ist dabei, dass die biologischen Stoffwechselprodukte nicht nur gemessen, sondern auch eindeutig identifiziert werden sollen, so dass Rückschlüsse auf die biochemischen Signalwege möglich sind. Dies unterscheidet die Methodik der Metabolomics von so genannten metabolischen Finger-Printing-Methoden, bei denen durch Mustererkennung unterschiedliche biologische Entitäten miteinander verglichen werden, ohne dass Rückschlüsse auf die beteiligten Signalwege möglich sind.

Bei der Bestimmung von Biomarkern können zum einen Einzelmarker untersucht werden, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Demgegenüber steht die Bestimmung von *Markersignaturen*, bei denen mehrere verschiedene Biomarker untersucht werden. Markersignaturen haben den Vorteil, dass verschiedene biologische Signalwege abgebildet werden können. Allerdings findet sich aufgrund der Heterogenität der untersuchten Signalwege und der unterschiedlichen technologischen Basis häufig nur ein geringer Überlappungsgrad zwischen den Biomarkersignaturen, die mit

Abb. 1 Tumor-netzwerke – unterschiedliche biologische Ebenen für prädiktive Biomarker

verschiedenen Methoden bestimmt werden. Letztendlich ist aber der molekulare Zustand in einem Tumor auf ganze verschiedene Art und Weise durch unterschiedliche Markerkombinationen und Einzelmarker zu beschreiben. Das heißt es wird immer mehrere parallele Biomarker geben, die vergleichbare Ergebnisse liefern. In einem systempathologischen Ansatz ist das Ziel, verschiedene Marker aus verschiedenen biologischen Ebenen zu erknüpfen, sodass eine möglichst vielfältige und reproduzierbare Information über das molekulare Verhalten des Tumors gewonnen werden kann.

Proteinmarker im Ovarialkarzinom

Durch immunhistologische Untersuchungen am paraffineingebetteten Tumorgewebe lassen sich prognostische Marker relativ einfach und sicher identifizieren – es handelt sich letztlich um „in-situ proteomics“. Diese Untersuchungen stellen eine klassische Methode der molekularen Pathologie dar. An Ovarialkarzinomen konnte in vorangegangenen Studien die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die eine wichtige Rolle bei der Prostaglandinproduktion und der Modulation der tumorassoziierten Entzündung spielt, als Prognosemarker identifiziert werden [1]. Die COX-2 ist Teil eines Netzwerkes, an dem auch der nukleäre Transporter CRM1 sowie das nukleozytoplasmatische „Shuttling-Protein“ HuR beteiligt sind [2, 3]. Diese Marker stellen ebenfalls prognostische Faktoren beim Ovarialkarzinom dar.

Zusammenfassend sind Biomarker auf Proteinebene gut im Paraffingewebe messbar und können durch die Immunhistologie untersucht werden. Ein Nachteil in der Immunhistologie ist, dass in der Regel keine oder nur eine sehr limitierte quantitative Bestimmung möglich ist. Zudem ist die Methode auf die Untersuchung einzelner bzw. kleinerer Gruppen von Markern beschränkt, was den multifaktoriellen Mechanismen der Tumprogression nur eingeschränkt Rechnung trägt. Ein Lösungsansatz besteht darin, quantitative Biomarker bzw. Kombinationen von Biomarkern, d. h. Markersignaturen, zu untersuchen.

Abb. 2 ▲ Metabolomics beim Ovarialkarzinom. Gaschromatographie (GC) zur Auftrennung der Metaboliten (oberer Teil), gefolgt von Massenspektrometrie (MS) zur Identifizierung der Metaboliten. (Mit freundl. Genehmigung aus [8])

RNA-Biomarker

Durch die Untersuchung von RNA-Molekülen lassen sich Informationen über die Expression der Gene im Tumorgewebe gewinnen. Infrage kommen hier zum einen Polymerasekettenreaktion- (PCR-)basierte Methoden zur Untersuchung von Einzelmarkern, aber auch Gen-Chip-basierte Methoden zur Untersuchung von Markerkombinationen. Ein Nachteil der RNA-bezogenen Methoden liegt darin, dass nach dem bisherigen Stand der Technik RNA-Moleküle am formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebe nur recht schwer zu untersuchen waren. Das Hauptproblem liegt dabei nicht in erster Linie in einer Degradation von RNA im Paraffingewebe, sondern das Problem sind die durch die Fixierung bedingten kovalenten Bindungen, die bei der Isolation der RNA zu einer weiteren Fragmentierung führen.

Es sind aber in den letzten Jahren eine Reihe von verschiedenen Methoden etabliert worden, die innerhalb des formalinfixierten Gewebes durch kovalente Bindungen sehr fest verankerten RNA-Moleküle schonend aus dem Gewebe herauszulösen, sodass eine ausreichende Fragmentlänge für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung steht. Dieses Problem kann durch neue Extraktionsmethoden also zumindest partiell gelöst werden, zudem ist es durch TaqMan-PCR-Methoden möglich, auch relativ kurze, d. h. nur aus 100–200 Basenpaaren bestehende, Fragmente zur quantitativen Analyse zu verwenden.

Eine der dabei verwendbaren Methoden besteht in einem nanotechnologischen Ansatz, bei dem die Nukleinsäuren aus dem Gewebe an magnetische Mikropartikel gebunden werden und dann in einem roboterbasierten Verfahren über

C. Denkert

Molekulares Profiling und prädiktive Signaturen. Biomarkeranalysen beim Ovarialkarzinom

Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist ein Tumor mit einer sehr ungünstigen Prognose. Zur genauen Planung der Therapie ist es wichtig, Biomarker im Tumorgewebe zu identifizieren, die eine Information über das Ansprechen auf eine Therapie bzw. die Entwicklung von Resistenzen zulassen. Diese Biomarker können auf verschiedenen biologischen Ebenen gemessen werden. Auf Proteinebene können prognostische Biomarker im Tumorgewebe mittels Immunhistochemie identifiziert werden. Auf RNA-Ebene können durch Anwendung neuer Extraktionsverfahren auch an paraffineingebettetem Archivmaterial Biomarker bestimmt werden. Zudem ist es möglich, durch Gen-Chip-Analysen prognostische Si-

gnaturen beim Ovarialkarzinom zu bestimmen. Ein neuer methodischer Ansatz besteht im Bereich der Metabolomics, in dem metabolische Profile im Tumor gemessen werden, die einen Rückschluss auf die Stoffwechselaktivität im Tumor zulassen. Für einen systempathologischen Ansatz und ein wirkliches Verständnis der Vorgänge im Tumorgewebe ist es wichtig, die verschiedenen biologischen Ebenen zu kombinierten Markersignaturen zu verknüpfen.

Schlüsselwörter

Ovarialkarzinom · Prädiktive Biomarker · Metabolomics · Genomics

Molecular profiling and predictive signatures. Biomarker analysis in ovarian cancer

Abstract

The identification of tissue-based biomarkers is a major task for molecular cancer research. As ovarian cancer is a malignancy with a particular poor prognosis, new diagnostic tests are needed for the planning of an individualized therapy. Diagnostic biomarkers are investigated on different biological levels using genomics, transcriptomics, proteomics or metabolomics as a major approach. Protein biomarkers as well as RNA biomarkers can be measured in formalin-fixed tissue using immunohistochemistry as well as new techniques for isolation of nucleic acids. Further-

more, gene expression as well as metabolic signatures can be determined using frozen tissue. In a first evaluation, metabolomics has been used to investigate different types of ovarian tumors. In a systems pathology approach the results from the different biological levels are integrated to a combined signature that reflects the biological behaviour of the tumor.

Keywords

Ovarian cancer · Predictive biomarkers · Metabolomics · Genomics

mehrere Extraktionsschritte aufgereinigt werden können. Diese Methode wurde von der Firma Siemens entwickelt und wird derzeit in mehreren Projekten am Ovarialkarzinom evaluiert. Hierbei können in einem automatisierten robotergetstützten Verfahren bis zu 48 Proben in 4 Stunden isoliert werden, Ausgangsmaterial ist ein 10 µm dicker Paraffinschnitt. Aus dieser Probe sind dann mehr als 100 PCR-Reaktionen möglich.

Die RNA-Extraktion ist gut geeignet, Nukleinsäuren aus Paraffingewebe herauszulösen und Biomarker – z. B. den Östrogenrezeptor, den Progesteronrezeptor und die Topoisomerase – zu untersuchen. Durch den Vergleich der RNA-Expression und mit immunhistologisch nachgewiesener Proteinexpression können die unterschiedlichen Methoden der Immunhistologie und der TaqMan-PCR gegenseitig validiert werden.

Prognostische Signaturen beim Ovarialkarzinom

Durch Gen-Chip-Untersuchungen können Markerkombinationen ermittelt werden, die eine prognostische Relevanz beim Ovarialkarzinom haben. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass mit der Gen-Chip-Methodik Genexpressionsprofile identifiziert werden können, die das Überleben beim Ovarialkarzinom vorher-sagen können [4, 5].

Allerdings besteht bisher nur ein recht geringer Überlappungsgrad der Genlisten aus den verschiedenen Studien zum Ovarialkarzinom. Zudem gibt es bisher keine unabhängigen Validierungen einzelner Signaturen an separaten unabhängigen Datensätzen. Dieses ist vor allem dadurch zu erklären, dass nur relativ wenige Gruppen über Patientenkohorten verfügen, an denen Genexpressionsuntersuchungen im Ovarialkarzinom mit ausreichender Fallzahl möglich sind. Diese Untersuchungen können derzeit zudem nur an Gefrierewebe durchgeführt werden.

Eine Möglichkeit der Durchführung solcher Studien besteht in der Kooperation mit klinischen Netzwerken. Ein solches Netzwerk ist die „Tumorbank Ovarian Cancer“ (TOC), die an der Klinik für Gynäkologie der Charité etabliert ist und in einem europaweiten multizentri-

schen Ansatz prospektiv Gewebeproben des Ovarialkarzinoms asserviert und eine standardisierte klinische und intraoperative Dokumentation garantiert. Derzeit sind 7 Zentren am TOC-Netzwerk beteiligt.

Wichtig ist es bei derartigen Untersuchungen, nicht nur genexpressionsbezogene Parameter zu evaluieren, sondern zudem klinische Parameter, wie z. B. den intraoperativen Tumorest, zur Entwicklung eines gemeinsamen prognostischen Scoring-Systems heranzuziehen. Ziel ist es dabei, einen prognostischen Genindex für das Ovarialkarzinom unter Platin-Taxol-Therapie zu etablieren, der in der multivariaten Analyse unabhängig vom Tumorest sein sollte und an einer externen Kohorte validiert werden kann.

Tumornetzwerke und Metabolomics

Wie oben bereits erwähnt, wird eine umfassende Bestimmung aller Metaboliten in einem biologischen System unter dem Begriff Metabolomics zusammengefasst. Metaboliten sind dabei die niedermolekularen Stoffwechselprodukte, die als Ergebnis der biochemischen Signalwege und der enzymatischen Reaktionen im Tumorgewebe entstehen.

Diese Metaboliten können als der verstärkte Output eines biologischen Systems angesehen werden [6, 7]. Das heißt diese Biomarker sind besonders interessant für molekulare Untersuchungen, weil in vielen Fällen durch relativ geringe Veränderungen der Enzymaktivität, bei denen die Proteinmenge häufig konstant bleibt, deutliche Veränderungen der Stoffwechselwege und der Metaboliten-Level erreicht werden können.

Aufgrund der Heterogenität der verschiedenen Metaboliten war es aber lange Zeit sehr schwierig, die unterschiedlichen Klassen von Stoffwechselprodukten in einem gemeinsamen Ansatz zu untersuchen. In den letzten Jahren haben jedoch Fortschritte bei der Geräteentwicklung sowie bei der bioinformatischen Analyse der Daten zu neuen Möglichkeiten geführt.

Der derzeitige Goldstandard zur Untersuchung von Metabolitenmustern besteht in der Gaschromatographie (GC), mit der die verschiedenen Substanzen

aufgetrennt werden, sowie einer anschließenden Massenspektrometrie (MS), mit der die einzelnen Substanzen dann auf der Basis von typischen Ionenmustern identifiziert werden können (■ Abb. 2).

Einige Arbeitsgruppen haben metabolische Signaturen im Gewebe bereits untersucht, aber es gibt nur wenige Studien, die verschiedene Tumortypen charakterisiert haben. Wir haben in einem ersten Ansatz [8] als biologisches Modell den Vergleich von Borderline-Tumoren des Ovars und invasiven Ovarialkarzinomen gewählt und an Gefrierproben die unterschiedlichen Metabolitenmuster evaluiert. Dieses Modell ist für die Evaluation einer Methode besonders gut geeignet, da es sich um klinisch sehr unterschiedliche Entitäten mit deutlich unterschiedlicher Prognose handelt, die aber vom histologischen Bild her zumindest eine gewisse Ähnlichkeit aufweisen. Wir konnten zeigen, dass Metabolitenmuster in der Lage sind, diese beiden Entitäten voneinander zu trennen und dass es möglich ist, die relevanten Stoffwechselwege zu identifizieren, die dann für weitere Untersuchungen als Grundlage herangezogen werden können. Für die Untersuchung haben wir 66 Ovarialkarzinome sowie 9 Borderline-Tumoren miteinander verglichen und die Metaboliten mittels GC-MS aufgetrennt. Es fanden sich 51 differenziell exprimierte Metaboliten ($p=0,01$).

Über ein neues Verfahren zur Verknüpfung von Metabolitendaten mit bereits existierenden biochemischen Signalwegen ist es möglich, von den Metabolitenmustern auf die relevanten Signalwege zurückzuschließen. Die Untersuchungen werden in dem aktuellen EU-Projekt „METAcancer“ mit dem Schwerpunkt Mammakarzinom fortgesetzt. Es hat – mit dem Einsatz verschiedener Methoden – das Ziel, die Untersuchung von Biomarkern auf Metabolitenebene mit den klassischen Biomarkern auf Protein- und RNA-Ebene in einem systempathologischen Ansatz zu verknüpfen. Dieses Projekt wird im Rahmen des 7. Rahmenprogramms der Europäischen Gemeinschaft gefördert.

Fazit für die Praxis

Zusammenfassend können Biomarkeranalysen auf verschiedenen Ebenen dazu dienen, Ovarialkarzinome besser zu charakterisieren und Informationen über das Ansprechen auf eine Therapie bzw. die Entwicklung von Resistenzen zu gewinnen. Diese Biomarker können auf verschiedenen biologischen Ebenen gemessen werden. Ein neuer methodischer Ansatz besteht im Bereich der Metabolomics, in dem ein Rückschluss auf die Stoffwechselaktivität im Tumor möglich ist. Für einen systempathologischen Ansatz und ein wirkliches Verständnis der Vorgänge im Tumorgewebe können die Biomarker aus verschiedenen biologischen Ebenen zu kombinierten Signaturen verknüpft werden.

Korrespondenzadresse

PD Dr. C. Denkert

Institut für Pathologie, Charité-
Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte
Charitéplatz 1, 10117 Berlin
carsten.denkert@charite.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Denkert C, Köbel M, Pest S et al. (2002) Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 160: 893–903
2. Noske A, Weichert W, Niesporek S et al. (2008) Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. *Cancer* 112: 1733–1743
3. Denkert C, Weichert W, Pest S et al. (2004) Overexpression of the embryonic-lethal abnormal vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. *Cancer Res* 64: 189–195
4. Spentzos D, Levine DA, Ramoni MF et al. (2004) Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 22: 4700–4710
5. Dressman HK, Berchuck A, Chan G et al. (2007) An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer. *Clin Oncol* 25: 517–525
6. Fiehn O, Weckwerth W (2003) Deciphering metabolic networks. *Eur J Biochem* 270: 579–588
7. Griffin JL, Shockcor J (2004) Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 4: 551–561
8. Denkert C, Budczies J, Kind T et al. (2006) Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res* 66: 10795–10804