Prädiktive und prognostische Brustkrebsmarker

Molekularbiologische Analyse von fixiertem Tumorgewebe als Basis

Trotz aller Erfolge lassen die aktuellen Therapierichtlinien für den behandelnden Arzt weitere Unsicherheiten bestehen, wie ein Patient tatsächlich optimal therapiert werden sollte. Dies ist v. a. dadurch bedingt, dass die heute mögliche Charakterisierung eines Tumors der Komplexität seiner Entstehung, seiner Progression und der Wechselwirkung mit seinem Träger weiterhin nicht gerecht wird. Nur eine detaillierte Erfassung der präzisen Ausprägung eines Tumors und seiner biologischen Schwachstellen kann eine wirklich individuelle und optimal wirksame Tumorthherapie ermöglichen. In den letzten Jahren sind zahlreiche methodische Ansätze verfolgt worden, diese Charakterisierung zu ermöglichen. Dabei nehmen molekularbiologische Untersuchungen der Tumoren zunehmend breiteren Raum ein.

Die Behandlung von Tumorerkrankungen hat in den letzten 30 Jahren in der industrialisierten Welt erhebliche Fortschritte gemacht. Auch wenn die Inzidenz vieler Tumorarten durch die verlängerte Lebenserwartung deutlich gestiegen ist, ist die verbleibende Lebenszeit vieler Patienten, die mit einer Tumordiagnose konfrontiert wurden, heute deutlich länger als noch vor wenigen Jahren. Möglich wurde dieser Fortschritt u. a. durch den Einsatz

molekularer Methoden in der Pathologie und die Einführung evidenz-basierter Richtlinien, wie ein bestimmter Tumortyp bei definierten Patientensubgruppen zu behandeln ist. Ein bekanntes Beispiel für solche Richtlinien sind die Empfehlungen der St.-Gallen-Konsensus-Konferenz für die Therapie von Brustkrebs.

Molekulare Analyse eines Tumors

Nukleinsäureisolation

Frischgewebe vs. fixiertes Material

Grundvoraussetzung für die erfolgreiche molekulare Analyse eines Tumors ist die Gewinnung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und/oder der Ribonukleinsäure (RNA) der Tumorzellen. Wichtig ist deshalb an dieser Stelle die Zugänglichkeit der Tumoren bzw. der Tumorzellen. Bei vielen soliden Tumoren ist dies heute durch Biopsie oder bei der Resektion des Tumors gegeben. Im zweiten Schritt müssen die Nukleinsäuren aus den erhaltenen Tumorzellen präpariert werden. Grundsätzlich kann diese Isolation direkt aus frischem bzw. direkt nach der Entnahme schockgefrorenem Gewebe oder aus vom Pathologen fixiertem Gewebe erfolgen. Technisch bietet die Isolation aus Frischgewebe erhebliche Vorteile. Vor allem bei der Isolation von RNA sind die erhaltenen Ausbeuten und die Längen der Nukleinsäurefragmente aus Frischgewebe norma-

lerweise ungleich größer als bei der Extraktion aus fixiertem Gewebe. Leider ist die Handhabung von Frischgewebe in der klinischen Routine problematisch. Das Einfrieren in flüssigem Stickstoff unmittelbar nach einem Eingriff und die notwendige ununterbrochene Kühlkette erfordern eine anspruchsvolle Logistik und sind mit erheblichen Kosten verbunden. Zudem erfordert auch die molekularbiologische Analyse eines Tumors zuvor die Begutachtung durch einen Pathologen – schon um sicherzustellen, dass tatsächlich Tumorzellen und nicht nur das umliegende Tumorbett analysiert werden. Zwar kann ein Pathologe, analog zum Schnellschnitt, auch Frischgewebe vor einer molekularbiologischen Analyse charakterisieren; die Genauigkeit dieser Charakterisierung gegenüber der Analyse von fixiertem Gewebe ist aber ggf. beeinträchtigt. Probenlogistik und die notwendige Einbindung der Pathologie legen damit den Schluss nahe, dass auch für eine Analyse von RNA aus Gewebe bzw. Tumorgewebe nur die Verwendung von fixiertem Material eine praktikable und gangbare Option darstellt.

Magnetische Nukleinsäureabsorption

Siemens Healthcare Diagnostics hat daher ein Verfahren zur Isolation von für molekularbiologische Analysen gut geeigneter RNA aus formalinfixiertem Ge-

webe entwickelt. Das Verfahren stellt eine Grundvoraussetzung für die anschließende molekulare Charakterisierung von Tumoren dar. Kernpunkt der neuen Methode von Siemens sind magnetische Partikel zur Absorption der aus dem Gewebe freisetzbaren Nukleinsäuren. Dabei weisen die Partikel von Siemens im Vergleich zu anderen Magnetpartikeln eine Reihe von Unterschieden auf: Sie sind mit einem Durchmesser von ca. 100 nm wesentlich kleiner als die meisten der bisher verwendeten Partikel, sie besitzen eine sehr gleichmäßige, sphärische Geometrie und einen sehr hohen Eisenanteil. Die damit verbundenen Eigenschaften sind eine große Oberfläche bei gutem Dispergierverhalten, eine reproduzierbare Pipettierfähigkeit der Magnetpartikelsuspensionen und ein exzellentes Magnetisierungsverhalten. Der Grund für diese Eigenschaften liegt in dem Herstellungsverfahren der Partikel. Während viele Magnetpartikel durch Kopräzipitation von Silica und basischen Eisensalzen aus Wasserglaslösungen erhalten werden – ein Verfahren, das technisch schwer zu kontrollieren ist – geht Siemens mit seinen Partikeln von industriell hergestellten Fotokopiertönen auf Eisenoxidbasis aus. Diese Pigmente besitzen außerordentlich gut definierte physikalische Eigenschaften und sind so ein sehr konsistenter Ausgangsstoff für die Herstellung von Magnetpartikeln. Bei Siemens wird anschließend Nanotechnologie eingesetzt, um die Partikel mit einer äußerst dünnen, kaum 1 nm starken Schicht von Silica zu umhüllen. Dabei wird die für das reproduzierbare Pipettieren wichtige Geometrie der Partikel nicht verändert; der für eine hohe Magnetisierbarkeit wichtige hohe Eisenanteil bleibt im Rahmen des analytisch Nachweisbaren gleich, während für die Bindung von Nukleinsäuren eine großflächige Siliziumdioxidoberfläche bereitgestellt wird.

Vollautomatisierte Analyseplattform

Siemens hat sein Verfahren zur Isolation von Nukleinsäuren auf der Basis dieser Partikel vollständig automatisiert. Die Analyseplattform ist das „VERSANT™ kPCR Molecular System“, das Ende des Jahres 2008 in den Markt eingeführt werden soll. Die fixierten und in Paraffin eingebette-

ten Gewebeschnitte, die das Ausgangsmaterial für die Isolation von Nukleinsäuren darstellen, werden ohne vorherige manuelle Entparaffinisierung in Kunststoffröhrchen auf dem Roboter platziert – danach verläuft der gesamte Prozess vollautomatisiert: Die Gewebeschnitte werden lysiert, die Nukleinsäuren auf den Magnetpartikeln adsorbiert, gewaschen und anschließend wieder abgelöst. Der Prozess lässt sich v. a. über den pH-Wert der Reagenzien und die Temperatur zugunsten einer optimalen Extraktion von DNA oder RNA adjustieren – trotzdem werden stets beide Nukleinsäurearten, wenn auch in unterschiedlichem Maß, erhalten. Durch enzymatischen Verdau der jeweils unerwünschten Nukleinsäure, DNA oder RNA, lässt sich am Ende trotzdem die reine gewünschte Nukleinsäurespezies erhalten. Das Verfahren erlaubt ohne weiteres Zutun des Operators, 48 Gewebeschnitte in weniger als 4 h zu prozessieren.

Nukleinsäureausbeute

Die RNA-Ausbeute aus Gewebeschnitten, die mehrere Jahre alt sind, ist dabei fast durchgängig sehr hoch: Die mittlere Ausbeute pro Schnitt beträgt 1 µg Gesamt-RNA – genug um etwa 500-kPCR-Analysen damit durchzuführen. Ca. 90% der Proben erlauben normalerweise mindestens 250-kPCR-Resultate, und 99% der Proben ergeben genug RNA, um 10–20 Assays durchzuführen. Damit sind alle Voraussetzungen gegeben, aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe genügend RNA für eine umfassende Expressionsanalyse zu isolieren. Bei Gewebe, dessen Fixierung in Formalin nicht mehr als einige Monate zurückliegt, was für klinische Anwendungen fast immer der Fall sein sollte, sind die Ausbeuten deutlich höher. Der erste Assay, für den Siemens neues Isolationsverfahren Anwendung finden wird, ist ein Brustkrebsprognosetest, der sich zurzeit in der Produktentwicklung bei Siemens befindet.

Brustkrebsdiagnose, -prognose und -therapie

Übertherapie vs. individuelle Risikostrategie

Brustkrebs, eine der häufigsten Neoplasien, ist in seinen frühen Stadien, v. a. be-

vor die umliegenden Lymphknoten von Tumorzellen infiltriert werden, eine vergleichsweise weniger aggressive Tumorerkrankung. Aus Studien, die in den 1970er und 1980er Jahren, als die Chemotherapie noch in ihren Kinderschuhen steckte, durchgeführt wurden, weiß man, dass ca. 70% der Patientinnen kein Rezidiv erleiden, wenn der Tumor ohne eine irgendgeartete systemische Therapie lediglich operativ entfernt wird. Es entwickeln 30% der Patientinnen Rezidive und versterben dann zumeist an den Folgen des Tumors. Auch mit den heutigen Mitteln der Diagnose bleibt es jedoch schwierig, für eine individuelle Patientin vorherzusagen, in welche der beiden Gruppen sie fällt. Dies hat gerade bei Brustkrebspatientinnen ohne Lymphknotenbefall in den letzten 3 Jahrzehnten zu einer beachtlichen Übertherapie geführt: Angesichts der Schwierigkeit, Patientinnen mit weniger gefährlichen Tumoren von denen zu separieren, die todbringende Tumoren tragen, wird heute eine große Anzahl von Patientinnen mit überaus aggressiven Chemotherapien behandelt, obwohl die Mehrzahl von ihnen dies überhaupt nicht benötigen würde. Angesichts der Schwere der Nebenwirkungen, die mit vielen dieser Therapien einhergeht, ist es daher vorteilhaft, Übertherapie als Behandlungsstandard durch eine dem individuellen Patientenrisiko angepasste Therapie zu ersetzen. Biomarker sind hier nach Überzeugung vieler Experten die Methode der Wahl.

Algorithmus zur Einschätzung des Metastasierisikos

So hat Siemens in Kooperation mit der Universität Mainz und auf Basis von Affymetrix „Whole Genome Gene Arrays“ einen auf der Analyse von 12 mRNAs basierenden diagnostischen Algorithmus identifiziert, mit dem sich die Patientinnen entsprechend ihres Metastasierisikos einteilen lassen. Dieser prognostische Algorithmus wurde mithilfe von publizierten und im Internet verfügbaren Affymetrix-Datensätzen erfolgreich validiert. Da frisches bzw. eingefrorenes Tumorgewebe in der Routine des Pathologielabors jedoch kaum Verwendung findet, wurde der frischgewebebasierte Prognosealgorithmus für die Analyse von formalinfixiertem Gewebe adaptiert. Kernelement

dieses Methodentransfers waren klinische Proben, die sowohl frisch eingefroren wie auch formalinfixiert vorlagen und so einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Expressionswerte in beiden Aufbereitungsformen des Gewebes erlaubten.

Da eine solche Adaptation natürlich Teil der Findungsstudie ist, war es unabhängig, den entwickelten Prognosetest in einer von der Findung unabhängigen Kohorte zu verifizieren. Zu diesem Zweck hat Siemens Healthcare Diagnostics zusammen mit einer Arbeitsgruppe an der Universität Aarhus in Dänemark 250 Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom mit dem Siemens-12-Gen-Algorithmus auf ihre Prognose hin untersucht. Von jeder in die Studie eingeschlossenen Patientin wurde, unter Anwendung von Siemens-Nukleinsäureextraktionsverfahren, RNA aus jeweils 2 formalinfixierten Gewebeschnitten extrahiert und alle 12 Gene in jeder Tumorseite mit kRT-PCR analysiert. Der Algorithmus erlaubte mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von ca. 40% in dieser von der Findung unabhängigen Kohorte die Vorhersage, ob eine Patientin infolge eines Tumorrezidivs versterben würde.

Fazit für die Praxis

Dieses Ergebnis unterstreicht, dass die Extraktion von Tumor-RNA aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe mit konsistent hoher RNA-Ausbeute und -Qualität möglich ist. Der Prozess ist bei Siemens komplett automatisiert und daher in vielen klinischen Laboren und Pathologielabors leicht einsetzbar. Diagnostische Algorithmen, die Siemens entwickelt hat, lassen sich auf der Siemens-kPCR-Plattform sicher sowie reproduzierbar messen und erlauben so den Einsatz von mit Genomics-Methoden entwickelten diagnostischen Signaturen auch außerhalb hoch spezialisierter Referenzlabors, in die diese signaturbasierten Tests im Begriff sind, einzugreifen zu finden. Der erste derartige Test befindet sich zurzeit bei Siemens Healthcare Diagnostics in der Produktentwicklung und bedeutet den Einstieg von Siemens in die gewebebasierte Diagnostik.

Korrespondenzadresse

C. Petry
Molekulare Forschung Deutschland,
Siemens Healthcare Diagnostics
Nattermann Allee 1, 50829 Köln
Christoph.Petry@siemens.com

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor ist bei Siemens angestellt und bezieht ein Gehalt von der Firma.

Zusammenfassung · Abstract

Pathologie 2008 · [Suppl 2] 29:181–183
DOI 10.1007/s00292-008-1081-4
© Springer Medizin Verlag 2008

C. Petry · M. Gehrmann · C. von Törne ·
K. Weber · U. Stropp · G. Hennig

Prädiktive und prognostische Brustkrebsmarker. Molekular- biologische Analyse von fixiertem Tumorgewebe als Basis

Zusammenfassung

In den zurückliegenden Jahren sind zahlreiche prognostische und prädiktive Multiparameteralgorithmen, basierend auf der Analyse von messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), veröffentlicht worden. Viele dieser Algorithmen erfordern RNA, die aus Frischgewebe bzw. frisch eingefrorenem Gewebe isoliert werden muss. Für die klinische Routine ist formalinfixiertes Gewebe jedoch ein weitaus geeigneteres Ausgangsmaterial. Siemens Healthcare Diagnostics entwickelt deswegen eine robotergestützte, vollautomatische Methode für die Extraktion von mRNA und Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus formalinfixiertem sowie paraffineingebettetem Gewebe für das Pathologielabor. Die Methode soll erstmals als Teil eines Prognosetests für das Metastase- und Todesrisiko von Patientinnen mit nodal-negativem Brustkrebs Anwendung finden, der sich ebenfalls bei Siemens Healthcare Diagnostics in der Produktentwicklung befindet.

Schlüsselwörter

Nodal-negativer Brustkrebs · Prognosetest · mRNA · DNA · Extraktionsmethode

Predictive and prognostic markers of breast cancer. Molecular biological analysis of fixed tumor tissue

Abstract

A multitude of prognostic and predictive multiparameter algorithms based on the analysis of mRNA have been published in recent years. Many of the algorithms require fresh or fresh frozen tissue as a source of the mRNA. However, practical considerations suggest formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE tissue) to be a more suitable starting material for routine diagnostic applications. Therefore, Siemens Healthcare Diagnostics is developing a fully automated method to extract mRNA and DNA from FFPE tissue for use in pathology laboratories. Initially, the method will be used as part of a prognosis assay to predict the likelihood of distant metastasis and death for node-negative breast cancer patients.

Keywords

Node-negative breast cancer · Prognosis test · mRNA · DNA · Extraction method