

Vorhersage von Erkrankungsverlauf und Therapieansprechen durch molekulare Marker beim Mammakarzinom

Evelyn Hauenstein, Bettina Kuschel, Alfons Meindl, Manfred Schmitt, Marion Kiechle und Nadia Harbeck

Frauenklinik der Technischen Universität München

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist – wie auch andere Karzinome – eine Erkrankung, die durch genetische Ereignisse im Zuge der Karzinogenese charakterisiert ist. Man versucht Art und Abfolge dieser Ereignisse immer genauer nachzuvollziehen. Zugleich besteht das Bemühen, bei Patientinnen mit Mammakarzinom Über- bzw. Untertherapie zu vermeiden und Tumoren besser hinsichtlich ihrer Aggressivität und ihres Therapieansprechens zu klassifizieren. Etablierte klinische und histopathologische Parameter sind hierzu nur unzureichend geeignet. In Anbetracht der Heterogenität der Tumoren bieten z.B. komparative Analysen einen vielversprechenden Ansatz, Genprofile als zusätzliche prognostische und prädiktive Marker zu finden und für die klinische Anwendung zu evaluieren. Für RNA-basierte Ansätze sind bereits klinische Validierungs- und Therapiestudien in Planung. Auch für DNA-basierte Techniken zur Beschreibung epigenetischer Phänomene haben erste klinische Daten Methylierungsmarker validiert, die signifikant und reproduzierbar mit Krankheitsverlauf und Therapieansprechen korrelieren. Vor der Überführung dieser molekularen Analysen in die klinische Praxis müssen jedoch bestimmte Qualitätskriterien erfüllt werden. Bevor nicht die zuverlässige methodische und klinische Validierung der bisher erhobenen Daten vorliegt, sollte der Einsatz von Multigenanalysen beim Mammakarzinom klinischen Studien vorbehalten bleiben. **Schlüsselwörter:** Brustkrebs, DNA-Methylierung, Multigenanalysen, Mammakarzinom

Summary

Breast cancer is – like other carcinomas – a disease characterised by certain genetic events in the course of carcinogenesis. It is important to gain a better understanding of the nature and time course of those events. Simultaneously, many efforts have been made to avoid either over- or under-therapy and to classify tumors better according to their aggressivity and therapy. For achieving a better classification of tumors, the existing established clinical and histopathological parameters are not sufficient. Regarding the heterogeneity of tumors, multigen analyses offer a promising prospect to establish such gene profiles as new prognostic and predictive markers and evaluate them for clinical use. For some RNA-based concepts, clinical studies for validation and therapy are already being planned. Also, first clinical data for DNA-based techniques describing epigenetic phenomena have been validated. Their correlation with disease progress and therapy response is significant and reproducible. Still before such molecular tests can be used for everyday clinical practice, certain quality criteria have to be fulfilled. Also as long as there is no reliable methodical and clinical validation of the existing data, the use of multigen analyses in breast carcinomas should be limited to clinical studies.

Keywords: breast cancer, gene profiling, DNA methylation, prognosis, response prediction

Einleitung

Das Mammakarzinom ist eine Erkrankung, bei der es erst im Genom eines ausdifferenzierten Gewebes zu vielfältigen Veränderungen kommt. Keimbahnmutationen (z.B. BRCA1/2) sind mit 2-5% bei Patientinnen mit Mammakarzinom eher selten. Zur völligen Entdifferenzierung mit Verlust der Wachstumskontrolle und weitgehend ungehemmter Proliferation ist in der Regel eine Vielzahl von Mutationsschritten notwendig. Das phänotypische Verhaltensmuster einer Neoplasie kann durch parakrine Einflüsse des Tumorstromas stark beeinflusst werden. Die resultierende Heterogenität der Erkrankung ist letztlich die phänotypische Ausprägung einer enormen genotypischen Bandbreite. Sie kann gegenwärtig selbst mit zahlreichen klinischen und molekularen Faktoren nur unzureichend beschrieben werden und beeinflusst letztlich auch auf das Ansprechen gegenüber medikamentösen Therapiemaßnahmen. Krankheitsverursachende bzw. -modifizierende Faktoren können beim Mammakarzinom an klinischen Proben, deren Daten zum Krankheitsverlauf maßgeblich von der verabreichten medikamentösen Therapie beeinflusst sind, nur schwer voneinander unterschieden werden. Durch die im Folgenden beschriebenen Analysemethoden, die daher beide Fragestellungen ansprechen, können Kandidatengene für weitere grundlagenorientierte Untersuchungen sowie für therapeutisch orientierte Interventionen erfasst werden.

Tab 1 Voraussetzungen für die Überführung von tumorassoziierten Biomarkern in die klinische Praxis

- Biologische Hypothese
- Standardisierung und Qualitätskontrolle des Testsystems
- Adäquate statistische Analyse
- Korrelation zu bisher bekannten Markern
- Cut off-Werte zur Unterscheidung klinisch relevanter Patientenkollektive
- Unabhängige Validierung (z.B. unabhängiges Patientenkollektiv, unabhängige Untersucher, Metaanalyse, prospektive klinische Studie)
- Klinische Relevanz – Einfluss auf Therapieentscheidung

Die klinische Erfahrung, dass von so genannten Standardtherapien trotz eines identischen Tumortyps immer nur eine mehr oder weniger große Subgruppe der behandelten Patienten profitiert, ist ein nur zu bekanntes Problem der modernen Onkologie.

Das Mammakarzinom gilt bereits bei Erstdiagnose als eine potentiell systemische Erkrankung, so dass die Standardtherapie aus Operation, ggf. Bestrahlung und eine medikamentösen Systemtherapie besteht. Beim primären Mammakarzinom erhalten Patientinnen eine vorbeugende (adjuvante) Chemotherapie aufgrund histologischer und klinischer Merkmale ihres Tumors. Zum Beispiel sind nach gültigen Leitlinien (1) bis zu 90% aller Patientinnen ohne Lymphknotenbefall Kandidatinnen für solch eine adjuvante Chemotherapie. Doch aufgrund der hohen Heilungschancen nodal-negativer Patientinnen, würden sehr wahrscheinlich 70-80% dieser Patientinnen auch ohne adjuvante Behandlung keine Fernmetastasen entwickeln. Diese Patientin hat möglicherweise nicht nur keinen Nutzen, sondern kann auch einen Schaden durch die Chemotherapie erleiden (durch Nebenwirkungen oder durch Zytostatika induzierte Zweitkarzinome).

Deshalb versucht man durch weitere prognostische und prädiktive Faktoren, Patientinnen genauer in Risikogruppen einzuteilen und Therapieansprechen besser vorhersagen zu können. Ziel ist es, nicht nur anhand von klinisch-pathologischen Kriterien wie Tumorgöße und Lymphknotenbefall,

sondern auch anhand der biologischen Eigenschaften des Tumors eine „maßgeschneiderte Therapie“ für jede Patientin zu entwickeln.

Etablierte klinische Prognosefaktoren erlauben, den Krankheitsverlauf für die einzelne Patientin abzuschätzen. Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz sind TNM-Status (Tumorgöße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung), Morphologie (Grading, histologischer Typ, peritumorale Lymphgefäßinvasion) und Steroidhormonrezeptorstatus (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor) (1).

Etablierte prädiktive Faktoren

Anhand prädiktiver Faktoren versucht man, Therapieerfolg und –ansprechen vorherzusagen. Die einzigen evidenzbasierten prädiktiven Faktoren, die nach heutigem Kenntnisstand zur Erstellung von Therapiekonzepten beim primären Mammakarzinom eingesetzt werden sollten, sind der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (Ansprechen auf endokrine Therapie), Menopausenstatus (ovarielle Ablation) und Her2neu-Status (Ansprechen auf Therapie mit Trastuzumab=Herceptin®) (1).

Neue tumorbiologische prognostische und prädiktive Faktoren

Um einen Tumormarker für die klinische Anwendung heranziehen zu können, muss nachgewiesen sein, dass das Messen des Markers tatsächlich Einfluss auf das klinische Management der Tumorerkrankung hat, sei es durch Verbesserung von

Überlebenszeit oder Lebensqualität für die Patienten oder durch Senkung der Behandlungskosten. Bevor ein Tumormarker jedoch zur klinischen Entscheidungsfindung herangezogen werden kann, sollte er bestimmte Bedingungen erfüllen (siehe Tabelle 1).

Beim Mammakarzinom haben als erste neue Faktoren zwei tumorassoziierten Proteolysefaktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA und PAI-1) aufgrund einer prospektiven Therapiestudie und einer Metaanalyse an über 8.000 Patientinnen das höchste klinische Evidenzniveau (LOE 1) erreicht (2). Gleichzeitig ist die biochemische uPA und PAI-1-Bestimmungsmethode durch ELISA international standardisiert und qualitätskontrolliert (2). Dennoch wird dieser Test nicht überall zur klinischen Entscheidungsfindung herangezogen. Grund dafür ist die für die Bestimmung von uPA und PAI-1 notwendige Asservierung von Frischgewebe unmittelbar nach Tumorexstirpation. Dies kann im klinischen Alltag nicht überall logistisch durchgeführt werden.

Molekulare Technologien und ihr Einzug in die Klinik

In den letzten 10 Jahren haben neue molekulare Technologien auch Anwendung beim Mammakarzinom gefunden. Insbesondere die komparativen Expressionsanalysen multipler Gene scheinen die Analyse prognostischer und prädiktiver Marker zu ermöglichen.

Für den klinischen Gebrauch haben sich Gen-Expressionsarrays durchge-

Tab 2 Übersicht über Gen-Expressionsstudien beim Mammakarzinom

Studie	Patienten	Kollektiv	Genchip	Gescreente Gene	Genprofil	Gewebe	Studienziele	Testergebnis
Chang et al <i>The Lancet</i> 2003, Bd 363, 362-369	24	Primäres Mammakarzinom	HgU95-Av2	12.625 cDNA Hybridisierungen	44-Gen-Signatur	Frischgewebe (gefroren): Prä- therapeutische Stanzbiopsie	PRÄDIKTION: Docetaxel neoadjuvant (4 x 100 mg/m ² q21)	Accuracy 88% Sensitivität 85% (10 von 11 sensitiven Tumoren korrekt klassifiziert) Spezifität 90% (11 von 13 resistenten Tumoren korrekt klassifiziert)
Jansen et al JCO Bd 23, 2005, 732-740	112	Metastasiertes Mammakarzinom: östrogenrezeptorpositiver Primärtumor	cDNA Micro- array, http:// microarrays.nki.nl	18.000 cDNA Hybridisierungen	81-Gen-Signatur	Frischgewebe (gefroren): östrogenrezeptor- positive Primärtumore	PRÄDIKTION: Tamoxifen first-line in Metastasierung	Sensitivität 77% (27 von 35 Patientinnen mit <i>progressive disease</i> korrekt klassifiziert) Spezifität 48% (15 von 31 Patientinnen mit objective response korrekt klassifiziert)
Van't veer et al. <i>Nature</i> 2002, Bd 415, 530-536	117 (18 BRCA1 2 BRCA2)	Primäres Mammakarzinom: Nodalnegativ, < 55 Jahre	Agilent	25.000 cDNA Hybridisierungen	70-Gen-Signatur	Frischgewebe (gefroren):	PROGNOSE: Risiko einer späteren Fernmetastasier- ung	Für 65 von 78 Patienten (83%) wurde das Outcome korrekt vorherge- sagt. 39 von 44 Patientinnen mit Metastasenfreiheit nach 5 Jahren korrekt klassifiziert 26 von 34 Patientinnen mit Fernmetastasen nach 5 Jahren korrekt klassifiziert
Van de Vijver et al. <i>N Eng J Med</i> 2002, 347 :1999- 2009	295	Primäres Mammakarzinom: pT1/T2, < 55 J. 151 N0, 144 N1 (befallene Lymphknoten) 61 N0 bereits im Kollektiv von van't Veer, <i>Nature</i> 2002	Agilent	24479 cDNA Hybridisierungen 1281 Kontrollge- ne (reporter genes)	70-Gen-Signatur	Frischgewebe (gefroren)	PROGNOSE: Risiko einer späteren Fernmetastasier- ung	115 Patientinnen mit good prognosis signature: 94,7% frei von Fernmetastasen nach 5 Jahren 180 Patientinnen mit poor prognosis signature: 60,5% frei von Fernmetastasen nach 5 Jahren
Wang et al. <i>The Lancet</i> 2005, 365 : 671-679	286 Training set: 115 Testing set: 171 von	Nodal-negatives Mamma- karzinom, keine adjuvante Systemtherapie	Affymetrix Human U133aGeneCh- ip	22.000 cDNA Hybridis- ierungen	76-Gen-Signatur 60 Gene für ER- positive, 16 Gene für ER- negative Tumo- ren	Frischgewebe (gefroren)	PROGNOSE: Risiko einer späteren Fernmetastasier- ung	Im testing set: Sensitivität 93% (52 / 56) Spezifität 48% (55 / 115)
Hedenfalk et al <i>N Engl J Med</i> 2001, 344: 539-548	21 BRCA1: 7 BRCA2: 7 sporadisch:7	Primäres Mammakarzinom	Research Genetics	5361 cDNA Hybridisierungen	176-Gen- Signatur	Frischgewebe (gefroren)	PROGNOSE: Unterschei- dung der Tumorentitäten: BRCA1, BRCA2 bzw. sporadische Tumoren	7 von 7 BRCA1-Tumoren und 14 von 15 Nicht-BRCA1- Tumoren korrekt klassifiziert. 5 von 8 BRCA2-Tumoren und 13 von 14 Nicht-BRCA2- Tumoren korrekt identifiziert
Paik et al <i>N Engl J Med</i> 2004, 351: 2817-26	668	Nodal negatives Mamma- karzinom, ER-positiv, adjuvante Tamoxifen- Therapie erhalten	Oncotype DX Assay, Genomic Health Inc.	Selektion der 21 Gene für den Assay aus 250 Kandidatenge- nen, die im Rahmen von 3 anderen Studien selektiert worden waren	21-Gen-Signatur 16 tumorassozii- erte Gene, 5 Referenzgene	Paraffin- Tumorblöcke	PROGNOSE: Unterteilung des Patientin- nenkollektivs in 3 Risiko- gruppen: Low risk: <10% Rückfall- risiko, intermediate risk: 10-30% Risiko high risk: >30% Risiko	Low risk-Gruppe: 6,8% mit Fernmetastasen nach 10 Jahren Intermediate risk-Gruppe: 14,3% High Risk-Gruppe: 30,5%

setzt. Die ersten klinisch interessan-
ten Arbeiten beim Mammakarzinom
befassten sich mit der prognosti-
schen Bedeutung, in letzter Zeit ka-
men wichtige Ansätze zur Prädiktion
von Therapieansprechen hinzu.

**Gen-Expressionsanalysen zur
Risikoabschätzung (Prognose)**

„Amsterdam 70-Gen Signatur“: Die
ersten Arbeiten zur klinischen Bedeu-
tung einer Gensignatur von einer Ar-
beitsgruppe am Niederländischen
Krebsforschungsinstitut fanden inter-
national große Beachtung. Van't Veer
et al. (3) entwickelten anhand eines

Kollektivs von 78 jungen Patientinnen
unter 55 Jahren mit nodal-negativem
Mammakarzinom eine Gen-Expres-
sionssignatur, um Lymphknotenstatus
und histologischer Differenzierungs-
grad für eine spätere Metastasierung
exakter vorhersagen zu können als
mit den bisher etablierten Prognose-
faktoren. Alle Patientinnen wurden mit
modifiziert radikaler Mastektomie
(n=35) oder brusterhaltender Therapie
(n=62) inklusive axillärer Lymphkno-
tendisektion, gefolgt von Strahlen-
therapie, behandelt. Nur fünf Patien-
tinnen erhielten anschließend eine
Chemo- (n=3) oder Hormontherapie
(n=2). 44 Patientinnen blieben über 5

Jahre hinweg krankheitsfrei, 34 Pa-
tientinnen entwickelten Fernmetasta-
sen.

Aus dem während der Operation in
flüssigem Stickstoff schockgefrorenen
Tumormaterial wurde RNA isoliert.
Daraus wurde cRNA hergestellt,
die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert
und auf Mikroarrays mit ca. 25000
menschlichen Genen hybridisiert wur-
de. Die Fluoreszenzintensitäten wur-
den im Vergleich zu einem Referenz-
pool aus der cRNA aller untersuchten
Tumoren quantifiziert. Die Expression
von etwa 5000 Genen war innerhalb
der verwendeten Tumorgruppe signi-

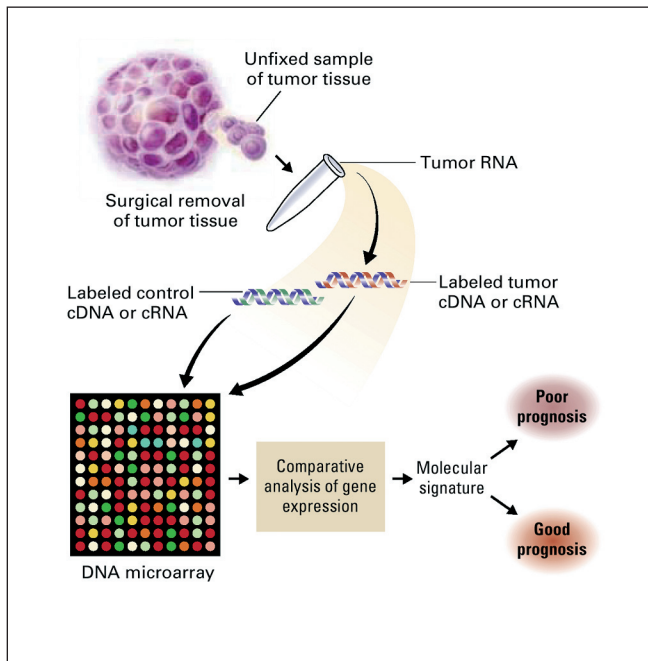


Abb 1 Wie eine Gensignatur gefunden wird?

Nach der Operation gefrorenes Tumorgewebe bildet das Startmaterial. Die Expressionsmuster eines Set von prognostisch relevanten Genen werden durch DNA-Microarray-Analyse bestimmt. Das Ergebnis sind molekulare Signaturen, nach denen Patienten in Gruppen mit schlechter oder guter Prognose eingeteilt werden können. Dadurch wird die klinische Entscheidungsfindung erleichtert.

Abdruck mit Erlaubnis von Sauter G, Simon R: Predictive molecular pathology. N Engl J Med 347, 1995-1996, 2002. Copyright Massachusetts Medical Society.

fikant heraufreguliert. Aus diesen wurden 70 Gene als „Markergene“ ausgewählt, die signifikant mit dem Krankheitsverlauf korrelierten. Anhand des Expressionsmusters dieser 70 Markergene ließen sich die untersuchten Tumoren in zwei Gruppen einteilen: In der ersten Gruppe befanden sich nur 34% der Patientinnen, die im Verlauf Fernmetastasen entwickelten, während dies bei 70% der Patientinnen in der zweiten Gruppe der Fall war. In der zweiten Gruppe, in der sich Patientinnen mit schlechter Prognose befanden, waren Gene heraufreguliert, die an Zellzyklus-Regulation, Invasion und Metastasierung, Angiogenese und Signaltransduktion innerhalb der Zelle beteiligt sind (z.B. Cyclin E2, Metalloproteinasen, VEGF). Selbst kleine Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen können diese für eine schlechte Prognose charakteristische Signatur zeigen, d.h. aufgrund ihres Genexpressionsmusters wären sie vorprogrammiert für eine Fernmetastasierung. Die Autoren stellen fest, dass ihr Klassifikationssystem den bisher benutzten klinischen Prognosefaktoren überlegen ist.

Van de Vijver et al. (4) verwenden das gleiche 70-Gene-Profil wie van't Veer. Anhand dessen klassifizierten sie 295 Patientinnen in zwei Gruppen mit guter und schlechter Prognose. Alle Patientinnen hatten Brustkrebs im Stadium pT1 oder pT2 und waren jünger als 53 Jahre. 151 hatten keine Lymphknotenmetastasen (61 davon waren schon Teil der van't Veer-Studie), 144 wiesen befallene Lymphknoten auf. Von den 295 Patientinnen hatten 180

eine für eine schlechte Prognose charakteristische Signatur und 115 eine für eine gute Prognose charakteristische Signatur. Die mittleren 10-Jahres-Überlebensraten betragen für die Gruppe mit der schlechten Prognose 54,6 +/- 4,4 Prozent und für die Gruppe mit der guten Prognose 85,2 +/- 4,3 Prozent. Mit dem Genprofil werden viel mehr Patientinnen in die Niedrig-Risiko-Gruppe eingeteilt (40%) als nach den bisher klinisch verwendeten Kriterien von St. Gallen (15%) und des NIH (7%).

„Rotterdam-Gensignatur“: In einer unabhängigen Arbeit bei einem nodal-negativen Patientenkollektiv filterten Wang et al (5) aus 22.000 Genen eine 76-Gen-Signatur heraus, die aus 60 Genen bei östrogenrezeptorpositiven und 16 Genen bei östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen besteht. Insgesamt wurden Tumoren von 286 Patientinnen (Altersdurchschnitt 52 Jahre) untersucht, die keinerlei adjuvante hormonelle oder chemotherapeutische Behandlung erhalten hatten. Das Gesamtkollektiv wurde in ein „training set“ (n=115) und ein „testing set“ (n=171) unterteilt. Die Gensignatur soll jene lymphknotennegative Patientinnen identifizieren, die innerhalb von 5 Jahren nach der Erstdiagnose Fernmetastasen entwickeln. Besondere prognostische Bedeutung zeigt das Genprofil bei prämenopausalen (n=84), postmenopausalen (n=87) und Patientinnen mit Tumoren von 10-20 mm Größe (n=79). Nach 5 Jahren entwickelten nur 7 % aus der Gruppe mit der guten Prognose Fernmetastasen. Die Autoren stellen fest, dass anhand

der Gensignatur nur für 52% der Patientinnen eine adjuvante systemische Chemotherapie empfohlen würde, während nach den Leitlinien von St. Gallen 90% der Patientinnen und nach den Richtlinien der National Institutes of Health (NIH) der USA 89% der Patientinnen eine Chemotherapie erhalten hätten. Deshalb könnte die Gensignatur dabei helfen, unnötige chemotherapeutische Behandlung bei lymphknotennegativen Brustkrebspatientinnen zu vermeiden.

Zwischen den Studien von Wang und van de Vijver gibt es nur eine Überschneidung von 3 Genen (Cyclin E2, origin recognition complex, TNF superfamily protein). Die Begründung sehen die Autoren darin, dass aus den 70 Genen von van de Vijver nur 48 auf dem von ihnen benutzten Affymetrix U133-Chip präsent sind, während nur 38 der von ihnen identifizierten Gene im Agilent-Chip der Amsterdamer Gruppe enthalten sind.

Multiplex PCR-Assay: Paik et al. (6) verwenden einen anderen methodischen Ansatz als die holländischen Arbeitsgruppen, die in Stickstoff-asserviertes Tumorfriischgewebe verwendeten. Paik et al. benutzten routinemäßig fixierte in Paraffin eingebettete Tumorblöcke, aus denen mRNA isoliert und eine rt-PCR durchgeführt wurde. Der Assay (Oncotype DX Assay, Genomic Health, Redwood City, CA, USA) untersuchte 21 prospektiv selektierte Gene, 16 davon tumorassoziiert und 5 Referenzgene. Bei den 16 tumorassoziierten Genen, die analysiert wurden, handelte es sich um

HER2, Östrogenstoffwechsel-Gene (ER, PgR, BCL2), Proliferationsgene (z.B. Ki67) und Invasionsgene (Cathepsin L2, Stromelysin-3). In einer ersten explorativen Studie wurde durch diesen 21 Gen Assay das Patientenkollektiv anhand des Rezidivrisikos in 3 Risikogruppen eingeteilt (niedriges Risiko: Rezidivrate < 10 %; mittel 10-30 %; hoch: > 30 %). Aus der Gewichtung der 16 tumorbezogenen Gene hinsichtlich des Rezidivrisikos wurde dann ein „Recurrence-Score“ berechnet. Zur Validierung dieses Algorithmus analysierten die Autoren dann mRNA-Expressionsprofile aus 668 Tumorblöcken von Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus und positivem Hormonrezeptorstatus, die adjuvant mit Tamoxifen behandelt worden waren. Die Patientinnen waren im Rahmen prospektiver multizentrischer Therapiestudien der amerikanischen NSABP-Studiengruppe behandelt worden. In diesem Validierungskollektiv betrug das 10-Jahres Rezidivrisiko für die Gruppe der Patientinnen mit niedrigem Risiko (51 %) 6,8%, für Patientinnen mit mittlerem Risiko (22%) 14.3 % und für Hochrisikopatientinnen (27%) 30.5 %.

Klinische Studie beim nodal-negativen Mammakarzinom: Nach der bisher vorgelegten retrospektiven unizentrischen Explorations- und Validierungsstudie soll nun die klinische Relevanz der „Amsterdam 70-Gen-Signatur“ in einer prospektiven klinischen Therapiestudie überprüft werden. Eine große Studie mit etwa 6000 Patienten wird derzeit konzipiert. Diese Multizenterstudie MINDACT („Microarray for Node-negative Disease may avoid Chemotherapy“) soll Patientinnen mit T1 und -2-Tumoren und negativen axillären Lymphknoten einschließen. Alle Tumoren werden mittels Gen-Microarray analysiert. Das endgültige Studienkonzept wird derzeit nach mehreren Design-Änderungen festgelegt. Geplant ist ein Vergleich der etablierten mit der neuen tumorbiologischen Tumorklassifikation: Stimmen die prognostische Einschätzung mittels Gensignatur (Hoch- oder Niedrigrisikogruppe) mit der klinisch-pathologischen Klassifizierung überein, wird die Entscheidung zur

Chemotherapie nach klinisch-pathologischen Kriterien gefällt. Stimmen Gensignatur und klinisch-pathologische Einschätzung nicht überein, so wird randomisiert, ob die Entscheidung zur systemischen Therapie anhand der Gensignatur oder der klinisch-pathologischen Parameter gefällt wird. Erste Ergebnisse der initialen methodischen Validierungsphase (6 Zentren aus 4 Ländern) der MINDACT Studie (291 Tumoren, retrospektiv analysiert) wurden im Dezember 2004 auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium diskutiert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Heterogenität zwischen diesen Ergebnissen und den ursprünglichen Daten aus Amsterdam (3), Fehlklassifikationen von Patientinnen konnten nicht ausgeschlossen werden. Mögliche Erklärungen hierfür sind u.a. unterschiedliche Gewebegewinnungs- und Lagerungstechniken in den Zentren sowie die Heterogenität der Patientenkollektive in den Originalarbeiten (z.B. durch überlappende Kollektive oder Einfluss adjuvanter Systemtherapien auf den Krankheitsverlauf). Derzeit ist ein Vergleich der beiden niederländischen Gensignaturen (Amsterdam, Rotterdam) geplant, um die Signatur festzulegen, die am besten für die klinische Studie geeignet ist.

Vorhersage von Therapieansprechen (Prädiktion)

Molekulare Klassifikation TAM-resistenter Mammakarzinome: Mit dem Ziel, eine Gensignatur zu finden, die das Ansprechen auf endokrine Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen vorhersagt, untersuchten Jansen et al. (7) 112 östrogenrezeptorpositive Primärtumoren von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom und bekanntem Therapieansprechen (52 Patientinnen mit objektivem Ansprechen auf Therapie und 60 Patientinnen mit fortschreitender Erkrankung). Mittels eines „training set“ (n=46) identifizierten sie eine Signatur von 81 Genen, die in Tamoxifen-sensiblen Tumoren anders reguliert werden als in Tamoxifen-resistenten. Aus diesen 81 Genen wurde eine prädiktive Signatur aus 44 Genen extrahiert, die an 66 weiteren Tumoren ausgetestet wurde. Diese Signatur

klassifizierte 27 von 35 Patientinnen mit fortschreitender Erkrankung (77% Sensitivität) und 15 von 31 Patientinnen mit objektivem Ansprechen (48% Spezifität) korrekt.

Expressionsprofile zum Ansprechen auf Docetaxel-Chemotherapie:

Chang et al. (8) identifizierten mit dem HgU95Av2-Genchip, der 25.000 Gene enthält, eine Signatur von 92 Genen, die das Ansprechen von Patientinnen auf neoadjuvante Chemotherapie mit Docetaxel vorhersagt. Sie untersuchten die Genexpression in Tumormaterial aus prätherapeutischen Stanzbiopsien von 24 primären Mammakarzinomen. Ihr Patientinnenkollektiv war sehr heterogen: Tumorgößen von 20x23 mm bis 5x5,5 cm Größe, prä- und postmenopausal, lymphknotenpositiv und -negativ, rezeptornegativ und -positiv, HER2 negativ und -positiv. Von den 24 Tumoren waren 46% sensibel für Docetaxel (n=11), während 53% (n=13) kein Ansprechen auf die Taxan-Chemotherapie zeigten. In einer ersten Analyse korrelierte die unterschiedliche Expression von 92 Genen signifikant mit dem Docetaxel-Ansprechen. In einem zweiten statistischen Validierungsschritt wurden 10 der 11 Taxan-sensiblen Tumoren durch die Gensignatur korrekt klassifiziert (91% Spezifität), ebenso 11 von 13 Taxan-resistenten Tumoren (85% Sensitivität). In den Operationspräparaten nach der Chemotherapie fand sich hingegen in allen 24 Präparaten molekulargenetisch eine Homogenität des verbliebenen Tumorgewebes.

DNA-Methylierungsmuster beim Mammakarzinom

Eine Methylierung am fünften Kohlenstoffatom von Cytosinnukleotiden enthält wichtige biologische Informationen. DNA-Methylierung verändert zwar die Nukleotidsequenz nicht, fügt aber potenziell reversible Information zum Genom hinzu (epigenetische Information). Obwohl Tumore in vielen Bereichen der Genome eher hypomethyliert sind, kommt es in den regulatorischen Bereichen von Genen eher zur Hypermethylierung. Auch bei Mammakarzinomen ist eine veränderte DNA-Methylierung verschiedener Gene und intragenetischer Regionen

beobachtet worden. DNA-Methylierung ist z.B. auch bei der Inaktivierung von Genen, die für das Ansprechen von Tumoren auf Hormontherapie verantwortlich sind, beteiligt (9). Erste Ergebnisse zeigen, dass auch durch DNA-Methylierungsanalysen am Primärtumor eine reproduzierbare Risikoeinteilung von Mammakarzinompatientinnen möglich ist.

Beim Nachweis der DNA-Methylierung handelt es sich um ein ideales, vielfältig einsetzbares diagnostisches Werkzeug. Zur Detektion verwendet man eine Bisulfit-Behandlung der DNA, nach der unmethyliertes Cytosin zu Uracil wird, während methyliertes Cytosin intakt bleibt. Ob eine Methylierung bestimmter Gene im Tumor stattgefunden hat, kann auch am archivierten Material, d.h. an Paraffinblöcken, festgestellt werden. Methylierungssignale können ebenso auf freier DNA in Körperflüssigkeiten erkannt werden (z.B. Urin, Speichel – für Screening-Zwecke), und das binäre Signal (Methylierung ja oder nein?) kann leicht quantifiziert werden. Die DNA-Methylierungsmaschinerie in der Zelle könnte ebenso als therapeutisches Ziel dienen (Zytostatikum Decitabine inaktiviert DNMT) (9).

Diskussion

Beim Mammakarzinom besteht wie bei anderen Karzinomkrankungen das Ziel, Über- bzw. Untertherapie der Patientinnen zu vermeiden und Tumoren besser hinsichtlich ihrer Aggressivität und ihres Therapieansprechens zu klassifizieren. Etablierte klinische und histopathologische Parameter sind hierzu nur unzureichend geeignet.

Als erste neue tumorbiologische Faktoren wurden zwei Invasionsmarker (uPA, PAI-1) auf höchstem Evidenzniveau validiert (2). Logistische Schwierigkeiten durch das für den biochemischen ELISA-Test notwendige Frischgewebe, das nicht an jedem Krankenhaus routinemäßig bereitgestellt werden kann, haben dazu geführt, dass diese Parameter zwar in nationale (1), nicht aber in internationale Leitlinien eingegangen sind.

Neuere Arbeiten befassen sich mit der klinischen Bedeutung von differenziellen Gensignaturen. Diese Arbeiten sind jedoch vielfach noch nicht über das Stadium explorativer Analysen herausgekommen, eine Anwendung in der klinischen Routine ist derzeit noch nicht zu empfehlen. Die Gründe hierfür sind vielfältig – im Prinzip erfüllen die bisher vorliegenden Studien noch nicht die eingangs erwähnten Kriterien zur Überführung neuer Tumormarker in die klinische Praxis.

Biologische Hypothese. Die einzelnen meist retrospektiven Studien verwenden unterschiedliche Gen-Sets, die Rationale für die Genauswahl auf den Chips ist oft nur unzureichend angegeben. Einzelne, auf Proteinebene mit dem Krankheitsverlauf korrelierende Faktoren müssen auf RNA Ebene nicht die gleiche klinische Bedeutung haben.

Standardisierte Testmethode. Die verwendeten Techniken sind zum Teil unveröffentlicht bzw. nicht reproduzierbar. Die Daten wurden einerseits an präoperativ gewonnenen Stanzbiopsiegewebe (8), an während der Operation in Stickstoff asservierten Gewebe (3, 5), andererseits aber auch an postoperativ fixierten Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe erhoben (6). Stanzbiopsien enthalten oft nur wenig Tumormaterial. In Deutschland werden derzeit leitliniengerecht etwa 90% aller Mammakarzinome präoperativ – u.a. zur besseren Operationsplanung - mittels Stanzbiopsie gesichert. Vom Zeitpunkt der Stanzbiopsie bis zur endgültigen operativen Tumorentfernung vergehen in der Regel einige Tage. Durch diese präoperative Verletzung des Brustdrüsen- und Tumorgewebes kommt es im noch zu operierenden Gebiet zu Heilungsprozessen, Veränderungen der Fibroblastenaktivität (10) und damit zu sekundär veränderten Proteinexpressionsmustern in den verletzten Geweben, die die Interpretation der Genexpressionsmuster am Operationspräparat (Frischgewebe oder Paraffin) bezüglich der Tumorcharakteristika erheblich erschweren können. Hier ist nicht bekannt, ob die an Primärtumorgewebe ohne vorherige Stanzbiopsie erho-

benen Genmuster direkt auf die heute nach Stanzbiopsie gewonnenen OP-Präparate übertragen werden können. Zur Analyse der geringen Gewebemengen aus Stanzmaterial liegen noch keine Daten hinsichtlich der Heterogenität des Tumorgewebes vor. Das Fixierungsreagenz Formalin kann DNA-Brüche verursachen, so dass man bei auf Paraffinmaterialien beruhenden Analysemethoden eine standardisierte Fixierung und eine genaue Angabe zu Lagerungszeiten fordern muss. Somit sollte bei auf mRNA-Analysen beruhenden Systemen aufgrund der kurzzeitigen mRNA-Stabilität dringend auf standardisierte Lagerungs- und Fixierungsschritte geachtet werden. Hinsichtlich dieser technischen Variablen liegen jedoch noch keine Erfahrungen bezüglich der Reproduzierbarkeit der Genexpressionsanalysemuster an großen Patientenkollektiven unter klinischen Routinebedingungen vor. Auch eine multizentrisch durchgeführte Qualitätskontrolle fehlt.

Statistische Analyse. Die Vielfalt statistischer Methoden bei der Entdeckung signifikant mit den jeweiligen Endpunkten korrelierter Genmuster stellt eine weitere technische Variable der Multigenanalysen dar. Michiels et al. (10) unternahmen den Versuch, sieben der kürzlich erschienenen Multigenanalyse-Studien in soliden Tumoren und hämatologischen Malignomen statistisch zu validieren. Sie stellten fest, dass die als Prädiktoren identifizierten Genmuster sehr instabil waren und stark von der Selektion der Patientinnen in der Trainingsgruppe abhingen. In ihrer Analyse kommen Michiels et al. zu dem Schluss, dass in 5 der 7 untersuchten Studien die Patientenselektion anhand der Genmuster nicht besser als war als eine Zufallseinteilung.

Klinische Validierung. In den bisher vorliegenden Expressionsstudien wurden entweder retrospektiv rezidivfreies- und Gesamtüberleben oder das Ansprechen auf verschiedene Medikamente (z.B. Docetaxel, Tamoxifen) als Endpunkte analysiert. Insgesamt waren nicht nur die jeweils benutzten Nachweismethoden, sondern auch die klinischen Kollektive zu

heterogen, um zusammenfassende Metaanalysen oder gepoolte Analysen durchführen zu können. Besonders bei der Zusammenstellung von Patientenkollektiven für retrospektive Analysen sollte auf ausreichende Patientenzahlen und eine homogene Zusammensetzung nicht nur hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter sondern auch hinsichtlich der verabreichten adjuvanten / palliativen Therapie geachtet werden. Kleine explorative retrospektive Analysen sind angesichts der Variabilität der übrigen Einflussfaktoren (z.B. Gewebegewinnung, Weiterverarbeitung, statistische Analyse) nicht weiterführend, um klare Interpretationen zu erzielen und damit die Berücksichtigung von Multigenanalysen in nationalen und internationalen Therapieempfehlungsrichtlinien auf ein empfehlenswertes und klinisch brauchbares Evidenzniveau zu heben.

Im Gegensatz zu den auf mRNA-Analysen beruhenden Genexpressionsmustern sind DNA-Methylierungsanalysen technisch robuster und damit besser für den klinischen Routinebetrieb geeignet. Die dazu bisher vorliegenden wenigen klinischen Daten beim Mammakarzinom sind zwar vielversprechend, aber allerdings noch als vorläufig zu bewerten.

Fazit

In Anbetracht der Heterogenität und Komplexität der Mammakarzinomkrankung und der anderer solider maligner Tumoren bieten Multigenanalysen einen interessanten vielversprechenden Ansatz, neue prognostische und prädiktive Genprofile zu finden und für die klinische Anwendung zu evaluieren.

Durch die gleichzeitige Erfassung mehrerer tumorbiologisch bedeutsamer Signalwege können Wechselwirkungen zwischen Faktoren dargestellt werden. Für einige mRNA-basierte Ansätze sind bereits klinische Validierungs- und Therapiestudien in Planung. Auch für DNA-basierte Techniken zur Beschreibung epigenetischer Phänomene haben erste klinische Daten Methylierungsmarker validiert, die signifikant und reproduzierbar mit

Krankheitsverlauf und Therapieansprechen korrelieren.

Bevor jedoch nicht die zuverlässige methodische und klinische Validierung der bisher erhobenen Daten vorliegt, sollte der Einsatz dieser neuen Nachweistechniken beim Mammakarzinom nicht für die Routine empfohlen werden, sondern klinischen Studien vorbehalten bleiben.

Literatur

1. AGO 2005 Leitlinien für die Behandlung des primären und des metastasierten Mammakarzinoms: www.ago-online.org
2. Schmitt, M., Harbeck, N., Daidone, M. G., Brynner, N., Duffy, M. J., Foekens, J. A., and Sweep, F. C. Identification, validation, and clinical implementation of tumor-associated biomarkers to improve therapy concepts, survival, and quality of life of cancer patients: tasks of the Receptor and Biomarker Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, *Int J Oncol.* 25: 1397-406., 2004.
3. van't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., and Friend, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature.* 415: 530-6., 2002.
4. van de Vijver, M. J., He, Y. D., van't Veer, L. J., Dai, H., Hart, A. A., Voskuil, D. W., Schreiber, G. J., Peterse, J. L., Roberts, C., Marton, M. J., Parrish, M., Atsma, D., Witteveen, A., Glas, A., Delahaye, L., van der Velde, T., Bartelink, H., Rodenhuis, S., Rutgers, E. T., Friend, S. H., and Bernards, R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer, *N Engl J Med.* 347: 1999-2009., 2002.
5. Wang, Y., Klijn, J. G., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Look, M. P., Yang, F., Talantov, D., Timmermans, M., Meijer-van Gelder, M. E., Yu, J., Jatkoe, T., Berns, E. M., Atkins, D., and Foekens, J. A. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer, *Lancet.* 365: 671-9., 2005.
6. Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F. L., Walker, M. G., Watson, D., Park, T., Hiller, W., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., Bryant, J., and Wolmark, N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer, *N Engl J Med.* 351: 2817-26. Epub 2004 Dec 10., 2004.
7. Jansen, M. P., Foekens, J. A., van Staveren, I. L., Dirkwager-Kiel, M. M., Ritstier, K., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Sieuwerts, A. M., Portengen, H., Dorssers, L. C., Klijn, J. G., and Berns, E. M. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling, *J Clin Oncol.* 23: 732-40., 2005.

8. Chang, J. C., Wooten, E. C., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S. G., Gutierrez, M. C., Elledge, R., Mohsin, S., Osborne, C. K., Chamness, G. C., Allred, D. C., and O'Connell, P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer, *Lancet.* 362: 362-9., 2003.

9. Martens, J. W. M., Nimmrich, I., Koenig, T., Look, M. P., Harbeck, N., Model, F., Kiechle, M., Klijn, J. G. M., Schmitt, M., Maier, S., and Foekens, J. A. Association of DNA Methylation of Phosphoserine Aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrence breast cancer, *Cancer Research.* 63:4101-7, 2003.

10. Michiels, S., Kocielny S., Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 2005; 365: 488-492, 2005.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Nadia Harbeck
Frauenklinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Ismaningerstr. 22
81675 München
Tel. 0049-89-4140-6658
Fax 0049-89-4140-4846
nadia.harbeck@lrz.tum.de