

Abschlussbericht über das Projekt „Plasma-Proteomanalyse zur Vorhersage des Ansprechens auf neoadjuvante Chemotherapie beim Mammakarzinom“

(gefördert durch das Georg-Stumpf-Stipendium 2005 der ACO/ASSO)

T. Bachleitner-Hofmann

■ Hintergrund

Beim lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom bzw. bei großen Tumoren, die ohne präoperative Tumorverkleinerung nicht mit ausreichender Sicherheit einer brusterhaltenden Therapie zuzuführen sind, ist die Verabreichung einer neoadjuvanten Chemotherapie mittlerweile therapeutischer Standard [1–3]. Wesentliche Vorteile des neoadjuvanten Therapiekonzepts sind einerseits die deutlich höhere Brusterhaltungsrate bei präoperativ behandelten Patientinnen, andererseits das statistisch signifikant verlängerte Überleben von Patientinnen, bei denen eine komplette pathologische Remission, d. h. das völlige Verschwinden aller invasiven Tumoranteile, erreicht werden kann [4]. Ein nach wie vor bestehendes Problem ist jedoch, dass die Verabreichung der neoadjuvanten Chemotherapie bis dato – in Ermangelung exakter prädiktiver Instrumente – auf Basis kollektiver Response-Daten erfolgen muss, da die genaue Vorhersage des Ansprechens im individuellen Patientenfall noch nicht mit Sicherheit möglich ist. Lediglich Faktoren wie Hormonrezeptorstatus, Differenzierungsgrad der Tumorzellen bzw. Proliferationsmarker wie etwa Ki-67 lassen grobe Rückschlüsse auf die Ansprechwahrscheinlichkeit zu [5].

Um eine bessere Vorhersage des individuellen Therapieerfolgs der neoadjuvanten Chemotherapie zu ermöglichen, wurde bereits mehrfach versucht, prädiktive Instrumente zu entwickeln, mittels derer genauere Rückschlüsse auf das Therapieansprechen möglich sind. Größte Bedeutung in diesem Zusammenhang kommt RNA-basierten Microarray-Analysen aus Tumorgewebe zu, bei denen das Expressionsprofil vieler tausender Gene bestimmt und mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie korreliert wird [6–8]. Im Rahmen des vorliegenden Projekts „Plasma-Proteomanalyse zur Vorhersage des Ansprechens auf neoadjuvante Chemotherapie beim Mammakarzinom“ wurde jedoch ein anderes Konzept verfolgt: Zugrunde liegende Hypothese war die Annahme, dass während der neoadjuvanten Chemotherapie bereits frühzeitig (also bereits innerhalb der ersten 24–48 Stunden nach Verabreichung des ersten Chemotherapiezyklus) Veränderungen im Organismus auftreten („Host response“), anhand derer das individuelle Ansprechen vorhergesagt werden kann. Als Medium für die Analysen wurde Patientenplasma gewählt, da es einerseits leicht zugänglich ist und andererseits zahlreiche Biomarker aus verschiedenen Geweben enthält, welche als Surrogatparameter für chemotherapiesoziierte Gewebeveränderungen herangezogen werden können.

Zentrale Fragestellungen des Projekts waren:

1. Gibt es frühzeitige Veränderungen im Patientenplasma, welche bereits nach der Gabe des ersten Chemotherapiezyklus auftreten?



Abbildung 1: T. Bachleitner-Hofmann, M. Gnant

2. Korrelieren bestimmte dieser Veränderungen mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie?

■ Methodik

Um die Zusammensetzung der Plasmaproteine („Plasmaproteom“) in ihrer Gesamtheit abbilden zu können und chemotherapiesoziierte Veränderungen im Plasmaproteom zu detektieren, wurde die Methodik der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (2-DIGE) gewählt: Hierbei werden die Plasmaproteine zweier verschiedener Zeitpunkte (Zeitpunkt 1: unmittelbar vor Beginn der Chemotherapie; Zeitpunkt 2: 24–48 Stunden nach Gabe des ersten Chemotherapiezyklus) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und danach mittels Gelelektrophorese nach isoelektrischem Punkt sowie Molekulargewicht aufgetrennt. So erhält man ein 2-dimensionales Bild, auf dem ca. 1000 Plasmaprotein-Spots gleichzeitig abgebildet sind, wobei Proteine, die sich in ihrem Plasmaspiegel während der Chemotherapie verändern, anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften detektiert werden können. In weiterer Folge können die Spots dann mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Für das vorliegende Projekt wurden Mammakarzinompatientinnen aus der neoadjuvanten Chemotherapiestudie 24 (6 Zyklen Epirubicin/Docetaxel vs. 6 Zyklen Epirubicin/Docetaxel + Capecitabin) der „Austrian Breast and Colorectal Study Group“ (ABCSG) untersucht, wobei insgesamt 25 Patientinnen aus dem Behandlungsarm Epirubicin/Docetaxel in die Analyse eingeschlossen wurden. Die Blutabnahmen für die Plasmaproteomanalysen erfolgten jeweils unmittelbar vor Gabe des ersten Chemotherapiezyklus sowie 24–48 Stunden danach.

■ Ergebnisse

Zunächst wurde mittels 2-DIGE untersucht, welche Plasma-protein-Spots sich im Zuge des ersten Chemotherapiezyklus verändern: Insgesamt zeigten sich bei 33 Spots signifikante Veränderungen zwischen den Zeitpunkten vor und nach Gabe des ersten Zyklus. Neben Proteinen wie Inter- α -Trypsin-Inhibitor und α -1-Antichymotrypsin konnten hier vor allem 3 Komplementfaktoren (C1r, C3, C4) identifiziert werden. Die Modulation des Komplementsystems konnte zunächst in einem „Discovery set“ von 12 Patientinnen gefunden und anschließend in einem „Validation set“ von weiteren 13 Patientinnen bestätigt werden. Als nächster Schritt wurde untersucht, inwiefern die Modulation/Aktivierung des Komplementsystems mit dem Ansprechen auf die Therapie korreliert: Wiederum wurde zunächst das „Discovery set“ untersucht, wobei die Modulation von 2 Isoformen des Komplementfaktors C3 eine signifikante Korrelation mit dem Ansprechen auf die Therapie aufwies. Auch hier konnten die Ergebnisse im „Validation set“ bestätigt werden.

■ Schlussfolgerungen

Die Daten des vorliegenden Projekts zeigen, dass es unter einer neoadjuvanten Chemotherapie mit Epirubicin/Docetaxel bereits innerhalb von 24 Stunden zu signifikanten Veränderungen im Plasmaproteom kommt, wobei in erster Linie eine Modulation des Komplementsystems zu verzeichnen ist. Von Interesse ist, dass die Veränderungen im Komplementsystem mit dem Ansprechen auf die Therapie korrelieren, was auf einen zukünftigen Einsatz der Plasmaproteomanalyse zur Vorhersage des Ansprechens auf neoadjuvante Chemotherapie hoffen lässt.

Danksagung: Besonderer Dank gilt Herrn Mag. Georg Stumpf für die Implementierung des Georg-Stumpf-Stipendiums der ACO-ASSO. Weiterer Dank gilt allen Kooperationspartnern der Studie, insbesondere Univ.-Prof. Dr. Günther Steger und Univ.-Prof. Dr. Richard Greil sowie deren Teams. Last – but not least – ein herzlicher Dank an alle Patientinnen, die an der Studie teilgenommen haben.

Literatur:

1. Gralow JR, Zujewski JA, Winer E. Pre-operative therapy in invasive breast cancer: reviewing the state of the science and exploring new research directions. *J Clin Oncol* 2008; 26: 696–7.
2. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Surg* 2007; 94: 1189–200.
3. Untch M, von Minckwitz G. Recent advances in systemic therapy: advances in neoadjuvant (primary) systemic therapy with cytotoxic agents. *Breast Cancer Res* 2009; 11: 203.
4. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seiniger UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 297–306.
5. Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H, Colleoni M, Denkert C, Eiermann W, Jackesz R, Makris A, Miller W, Pierga JY, Semiglazov V, Schneeweiss A, Souchon R, Stearns V, Untch M, Loibl S. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 1927–34.
6. Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, Lecoche M, Metivier J, Booser D, Ibrahim N, Valero V, Royce M, Arun B, Whitman G, Ross J, Sneige N, Hortobagyi GN, Pusztai L. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2284–93.
7. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003; 362: 362–9.
8. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, André S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R, Delorenzi M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009; 15: 68–74.

Korrespondenzadresse:

Ao. Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Bachleitner-Hofmann
Klinische Abteilung für Allgemeinchirurgie

Medizinische Universität Wien

A-1090 Wien, Währinger Gürtel 18–20

E-Mail: thomas.bachleitner-hofmann@meduniwien.ac.at