

Tissue Microarray:

Molekulare

Hochdurchsatzforschung

beim Prostatakarzinom

Schlomm T

Blickpunkt der Mann 2007; 5 (2)

28-30

Homepage:

www.kup.at/dermann

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

**Krause & Pachernegg GmbH
Verlag für Medizin und Wirtschaft
A-3003 Gablitz**

Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf
Erscheinungsort: 3003 Gablitz

Tissue Microarray: Molekulare Hochdurchsatzforschung beim Prostatakarzinom

T. Schlomm

Zelluläre Veränderungen, die für die Entstehung und den Progreß von Tumoren verantwortlich sind, können auf molekularer Ebene analysiert werden und stellen gleichzeitig potentielle Angriffspunkte für neue Therapien dar. Neue Gen-Chip-Methoden erlauben heutzutage die Analyse aller beim Menschen bekannten Gene in einem einzelnen Experiment. Auf diese Weise wurden in jüngster Zeit beim Prostatakarzinom zahlreiche neue potentielle Biomarker zur Diagnose und Prädiktion des Prostatakarzinoms identifiziert. Jedoch ist bisher keines dieser Moleküle in die Routinediagnostik eingegangen. Die große Herausforderung besteht in der sinnvollen Validierung dieser enormen Datenmengen sowie der Formulierung klinisch relevanter Endpunkte. Am Beispiel der Tissue Microarray-Technik wollen wir den potentiellen Stellenwert molekularer Marker in der Diagnose, Prognoseabschätzung und Therapie des Prostatakarzinoms anhand eigener Daten diskutieren.

Significant cellular alterations required for development and progression of cancer are detectable at the molecular level and represent potential targets for gene-specific therapies. Modern Gene-Chip techniques allow for the parallel analysis of virtually all known human genes in a single experiment. Using modern high-throughput techniques, numerous potential new biomarkers for diagnosis and prediction of prostate cancer have been identified. However, so far, none of these markers has improved clinical practice. One of the most important challenges in the next years is the extensive clinical validation of molecular data using clinically relevant endpoints. The potential importance of molecular markers for diagnosis and prediction of prostate cancer is discussed exemplarily for the Tissue Microarray technique. **Blickpunkt DER MANN 2007; 5 (2): 28–30.**

Im klinischen Management des Prostatakarzinoms erfahren wir täglich Einschränkungen durch die unzureichende Spezifität des prostataspezifischen Antigens (PSA), die ungenaue Vorhersagbarkeit des Krankheitsverlaufes und unbefriedigende Therapiemöglichkeiten metastasierter Tumoren. Kann uns die Molekularbiologie helfen, diese Probleme zu lösen? Unzählige Studien haben bisher zahlreiche vielversprechende molekulare Marker hervorgebracht, von denen sich jedoch bisher keiner in der klinischen Routine durchsetzen konnte [1]. Erklärungen für dieses ernüchternde Ergebnis sind die zu geringen Stichprobengrößen und fehlendes Follow-up der meisten molekularen Studien, nicht standardisierte Versuchsprotokolle und subjektive Auswertungskriterien [1]. Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, daß wichtige Prozesse in der Tumorbio-logie des Prostatakarzinoms noch nicht vollständig entschlüsselt sind.

In der molekularen Tumorforschung hat im vergangenen Jahrzehnt ein Paradigmenwechsel weg von der hypothesenbasierten Forschung hin zum Hochdurchsatzscreening stattgefunden. Solche manchmal etwas abschätzig auch als „Fishing Expeditions“ bezeichneten Experimente haben das Ziel, viele tausend biologische Meßgrößen parallel zu untersuchen („high throughput“).

In unserer Arbeitsgruppe nutzen wir die cDNA-Microarray- und Matrix-CGH-Technik zur parallelen Analyse aller beim Menschen bekannten Gene auf dem RNA- und DNA-Level [2, 3]. Da diese Methoden technisch sehr aufwendig sind, werden nur relativ wenige initiale Untersuchungen zum Screening nach neuen Marker-Signaturen durchgeführt. Wir halten dabei die technisch bedingte Varianz dieser Analysen durch standardisierte Gewebe-Aufarbeitung und Laser-Mikrodissektion so gering wie möglich [4, 5]. „High throughput screening“-Analysen zeichnen sich oft durch ein enormes Mißverhältnis zwischen Stichprobengröße ($n < 100$) und Anzahl untersuchter Variablen ($n > 30.000$)

aus. Deshalb ist eine unabhängige technische und methodische Validierung der aus Array-Analysen gewonnenen Daten notwendig. Hierzu nutzen wir eine Array-basierte Taqman RT-PCR-Technik (Low-Density Arrays). Mit dieser Methode lassen sich bis zu 400 Einzel-PCRs in einem Experiment durchführen. Ziel ist hierbei, die statistische Relevanz der identifizierten Marker an größeren Tumorkollektiven zu ermitteln (methodische Validierung). Für bisher nicht annotierte Gene kann zusätzlich deren Funktion untersucht werden (funktionelle Genomanalyse) [2].

Für eine aussagekräftige klinische Validierung ist es notwendig, molekulare Veränderungen in einem großen Tumorkollektiv mit dokumentierten klinisch-pathologischen Daten und Langzeit-Follow-up zu untersuchen. Unsere Arbeitsgruppe hat hierfür einen bisher einzigartigen Gewebechip (TMA) hergestellt (Abb. 1). Dieser Chip enthält ca. 3500 Prostatakarzinome mit komplett dokumentiertem Langzeit-Follow-up und erlaubt erstmals Korrelationen von molekularen Markern zur Langzeitprognose an einem statistisch aussagekräftigen Kollektiv von Prostatakarzinompatienten [6]. Weiterhin können mit Hilfe dieser neuen Diagnostikplattform Verknüpfungen zwischen verschiedenen Genen und Proteinen hergestellt werden, die bisher aufgrund ihrer geringen Prävalenz an kleinen Tumorkollektiven nicht aufgefallen sind [7]. Mit der Anzahl der untersuchten Marker steigt die Menge der möglichen Verknüpfungen proportional an, was uns erlaubt, auch verschiedene Muster von Markern zu analysieren. Die biologische Funktion bisher unbekannter Gene wird mit Hilfe von zellulären Hochdurchsatz-Assays (funktionelle Genomik) analysiert (Abb. 2). Hier wird die Beteiligung dieser Gene an zentralen tumorrelevanten Prozessen wie Zell-Proliferation, Apoptose oder Migration getestet, was zu einem besseren Verständnis ihres Zusammenhangs mit Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms führt.

Prognose

Die prognostische Relevanz zahlreicher Gene aus den eigenen Arrayexperimenten sowie bekannter prostatakarzinomassoziierter Gene wurde bereits mit Hilfe un-

Aus der Martini-Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Korrespondenzadresse: Dr. med. Thorsten Schlomm, Martini-Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, D-20246 Hamburg, Martinistraße 52; E-Mail: tschlomm@uke.uni-hamburg.de

seres TMAs untersucht. Bei nahezu allen Genen konnte eine statistisch signifikante Korrelation zur Prognose dokumentiert werden [6, 8–10]. Nach unserer Einschätzung können einige dieser Marker hoffnungsvolle Kandidaten auf dem Weg zur Unterscheidung von indolenten und signifikanten Prostatakarzinomen darstellen (Molekulares Staging). Um Marker zur Vorhersage des natürlichen Verlaufs beim Prostatakarzinom zu untersuchen, müssen prognoseassoziierte Marker in weiteren Schritten an Prostatabiopsien von Patienten mit einem dokumentierten natürlichen Krankheitsverlauf (z. B. aus „Watchful waiting“-Strategien) untersucht werden. Hierzu hat unsere Arbeitsgruppe bereits die technischen Grundlagen entwickelt, um zahlreiche Prostatabiopsien in einen Tissue Microarray zu integrieren. Auf diese Weise können nun standardisierte Analysen an tausenden Prostatabiopsien simultan durchgeführt werden.

spielsweise für die Behandlung einer Untergruppe von metastasierenden Mammakarzinomen zugelassen, bei denen eine Her2-Positivität (Proteinüberexpression/Genamplifikation) besteht. Das Anti-EGFR-Medikament Iressa (Gefitinib) hat sich bei den seltenen Lungenkarzinomen mit Mutationen im Bereich der Exons 18 bis 21 als hochwirksam erwiesen [11, 12]. Obwohl genspezifische Medikamente bisher nur bei ganz vereinzelt Tumorindikationen zum Einsatz kommen, ist bereits bekannt, daß analoge Veränderungen der Zielgene dieser Medikamente auch bei anderen Tumortypen vorkommen. Her2-Amplifikationen wurden beispielsweise neben Mammakarzinomen u. a. auch bei Karzinomen von Harnblase, Pankreas, Magen, Ösophagus, Kolon, Lunge, Gallenblase oder Endometrium gefunden [13–15]. Es bleibt zu hoffen, daß diese oder andere Medikamente in Zukunft auch beim Prostatakarzinom einen therapeutischen Nutzen zeigen werden.

Therapie

Beim metastasierten, hormonresistenten Prostatakarzinom besteht ein dringender Bedarf an wirksamen Medikamenten. Viel wird von einer neuen Generation von Krebsmedikamenten erwartet, welche ganz gezielt molekulare Veränderungen von Tumorzellen attackieren. Alle diese Medikamente werden heute bei einigen wenigen Tumortypen eingesetzt, bei denen die molekulare Zielläsion des entsprechenden Medikamentes bekanntermaßen auftritt. Herceptin ist bei-

Zusammenfassung

Molekulare Screeningmethoden haben das Potential, bisher noch unbekannte biologische Prozesse in der Karzinogenese und Progression onkologischer Erkrankungen aufzudecken. In Zukunft wird eine der Hauptaufgaben die sinnvolle Verknüpfung molekularer Analysedaten mit klinisch relevanten Daten sein. Die Tissue Microarray-Technik erlaubt die parallele molekulare Analyse tausender Tumoren und Korrelation der

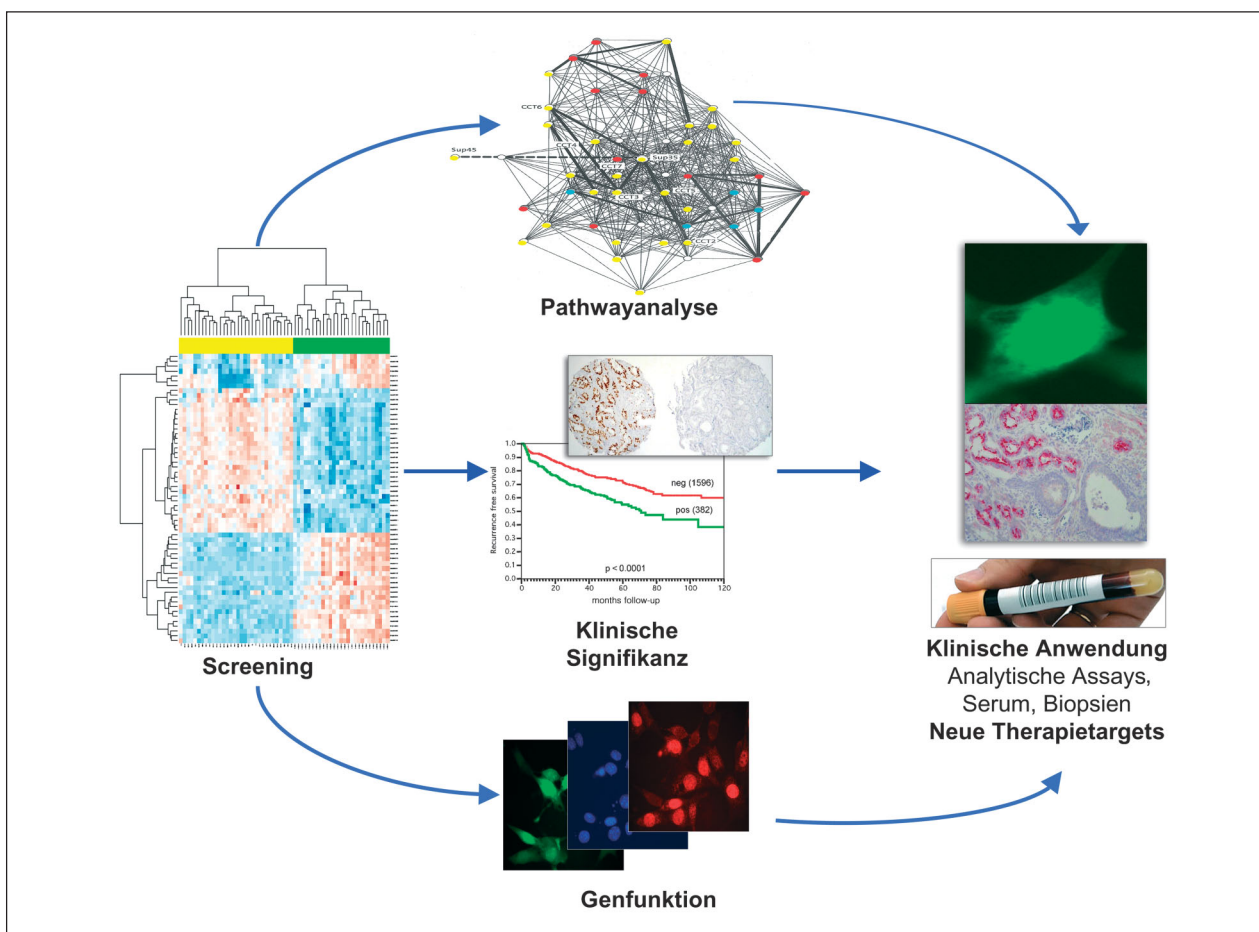


Abbildung 1: Analyseplattform zur molekularen High-throughput-Forschung.

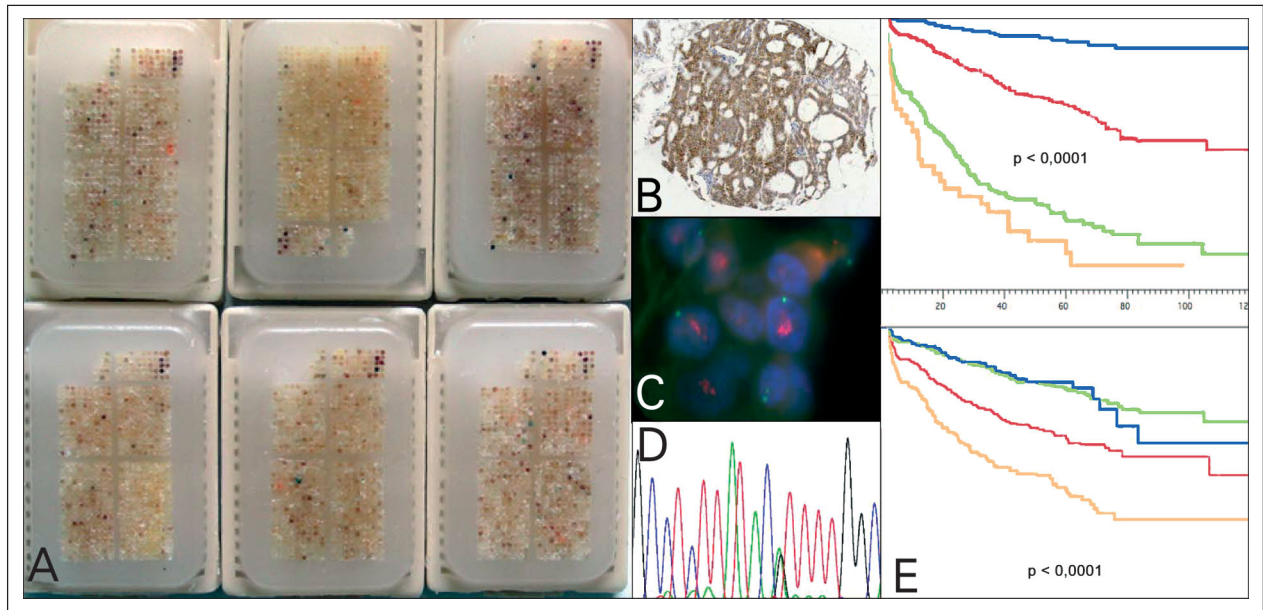


Abbildung 2: Klinische Validierung. **A)** Prostatakarzinom Tissue Microarray (TMA) bestehend aus 3200 verschiedenen Tumoren aus der Hamburger Tumorbank. **B)** Proteinexpression (Immunhistochemie). **C)** Nachweis einer Genamplifikation mittels Fluorescence-in-situ-Hybridization (FISH). **D)** Mutationsanalyse (Sequenzierung). **E)** Korrelation molekularer Veränderungen mit klinischen Langzeitdaten.

gewonnenen Daten mit klinischen Verlaufsdaten. Die Applikation dieser Technik an Prostatabiopsien verspricht die Identifikation neuer Marker zur Vorhersage des natürlichen Krankheitsverlaufs und Therapieansprechens von Prostatakarzinomen. Tumorbiologisch relevante molekulare Prozesse stellen gleichzeitig potentielle Ziele für neue genspezifische Medikamente (Target-Therapie) dar. Der therapeutische Nutzen solcher Marker muß parallel mit zellulären Funktionsassays und im Tiermodell getestet werden. Es ist zu erwarten, daß sich molekulare Veränderungen, die sich im Gewebe abspielen, auch im Blut oder Urin nachweisen lassen. Ein Hauptziel unserer Forschung ist die Detektion neuer Serum- und Urinmarker zur Diagnose und Prognoseabschätzung beim Prostatakarzinom. Die vorgestellte Analyseplattform (Abb. 2) ermöglicht ein globales Screening nach neuen Markern und die notwendige umfassende klinische Validierung zur Etablierung neuer diagnostischer und prognostischer Tests sowie neuer Therapiestrategien beim Prostatakarzinom.

Literatur:

- Schlomm T, Erbersdobler A, Mirlacher M, Sauter G. Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World J Urol* 2007; 25: 19–30.
- Arlt D, Huber W, Liebel U, Schmidt C, Majety M, Sauer mann M, Rosenfelder H, Bechtel S, Mehrle A, Bannasch D, Schupp I, Seiler M, Simpson JC, Hahne F, Moosmayer P, Ruschhaupt M, Guilleaume B, Wellenreuther R, Pepperkok R, Sultmann H, Poustka A, Wiemann S. Functional profiling: from microarrays via cell-based assays to novel tumor relevant modulators of the cell cycle. *Cancer Res* 2005; 65: 7733–42.
- Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Janicke F, Sauter G, Simon R. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 655–60.
- Schlomm T, Luebke AM, Sultmann H, Hellwinkel OJ, Sauer U, Poustka A, David KA, Chun FK, Haese A, Graefen M, Erbersdobler A, Huland H. Extraction and processing of high quality RNA from impalpable and macroscopically invisible prostate cancer for microarray gene expression analysis. *Int J Oncol* 2005; 27: 713–20.
- Schlomm T, Naekel E, Lubke A, Buness A, Chun F, Steuber T, Graefen M, Simon R, Sauter G, Poustka A, Huland H, Erbersdobler

- A, Sultmann H, Hellwinkel OJ. Marked gene transcript alterations occur early during radical prostatectomy. *Eur Urol* 2007 (in press).
- Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A. Rare p53 alterations have high prognostic relevance in early stage prostate cancers. *Int J Cancer* 2007 (in press).
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844–7.
- Schlomm T, Iwers L, Mirlacher M, Graefen M, Haese A, Steuber T, Chun KH, Hellwinkel OJ, Huland H, Simon R, Sauter G, Erbersdobler A. Low level HER2 expression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. 2007 (submitted).
- Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Daniel T, Steuber T, Walz J, Chun F, Haese A, Koller mann J, Graefen M, Huland H, Sauter G, Simon R, Erbersdobler A. Clinical significance of EGFR protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. 2007 (submitted).
- Schlomm T, Petersen A, Kramme I, Mirlacher M, Hellwinkel OJ, Walz J, Steuber T, Chun FK, Haese A, Heinzer H, Graefen M, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A, Simon R. Alterations of the physiological PSMA expression patterns are associated with poor prognosis in prostate cancer. 2007 (submitted).
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497–500.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129–39.
- Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12 (Suppl 1): S15–S19.
- Scholl S, Beuzebec P, Pouillart P. Targeting HER2 in other tumor types. *Ann Oncol* 2001; 12 (Suppl 1): S81–S87.
- Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol* 2007; 20: 192–8.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)