

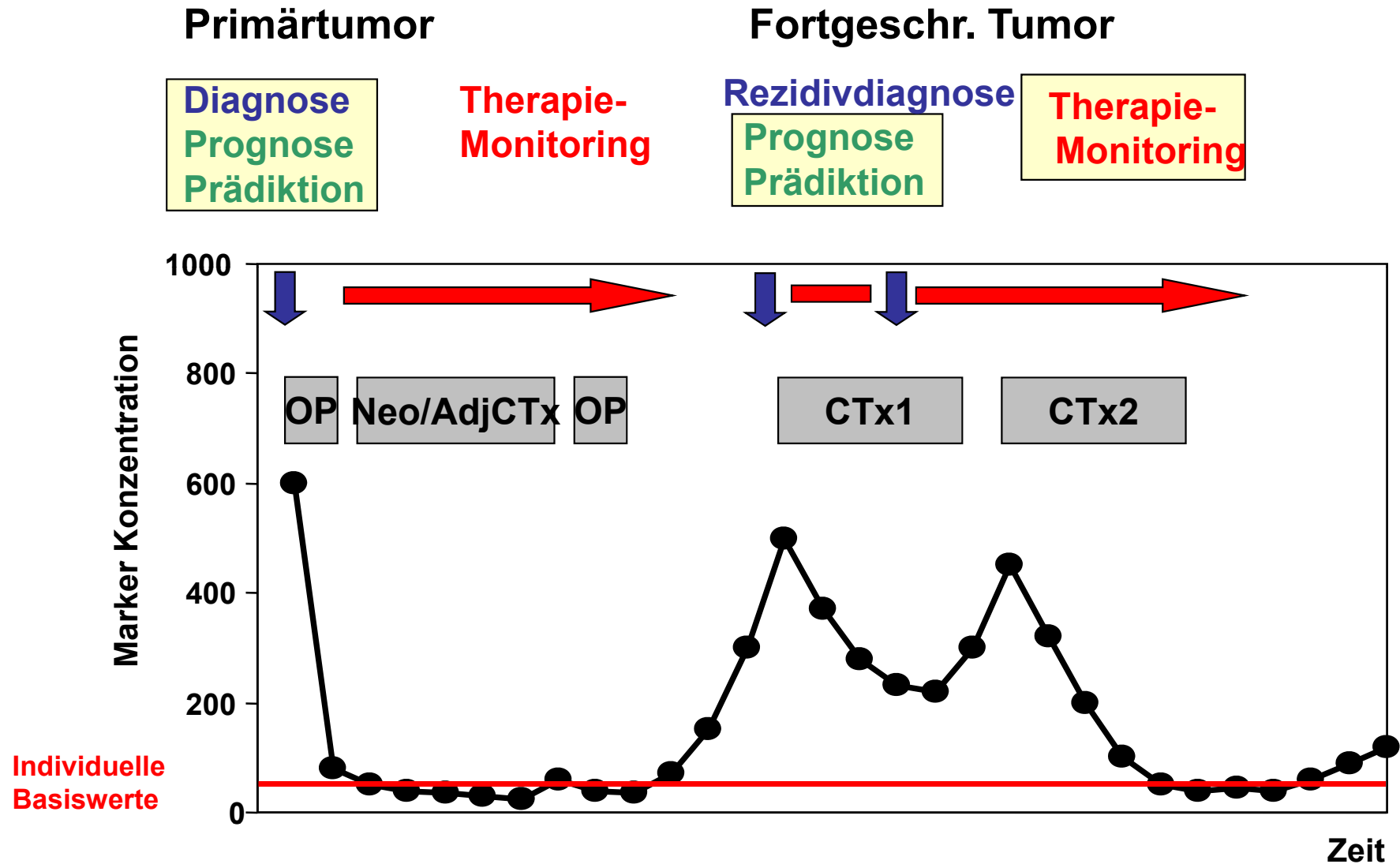
# Zirkulierende Apoptose-Marker als diagnostische und prädiktive Faktoren

---

**Oliver J Stötzer, Debora Fersching, Christoph Salat,  
Volker Heinemann, Stefan Holdenrieder**

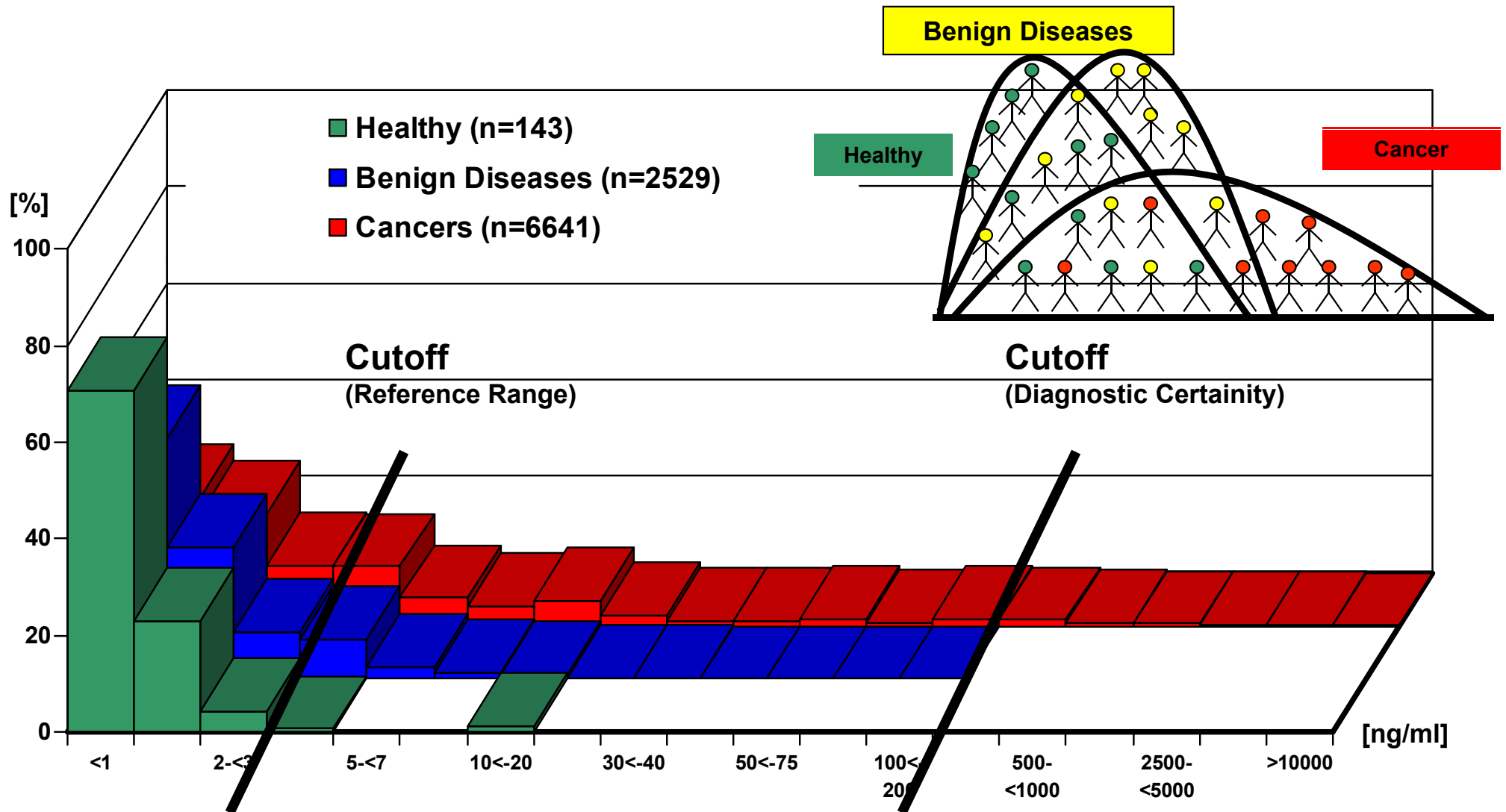
*Hämato-onkologische Schwerpunktpraxis München  
Institut für Klinische Chemie, Medizinische Klinik III,  
Klinikum der Universität München  
Institut für Klin Chemie und Klin Pharmakologie, Universität Bonn*

# Biomarker: Laborparameter als Entscheidungshilfe für die Diagnosestellung und Therapieentscheidung



# Werteverteilung von CEA

## in verschiedenen Patientengruppen



# **Mammakarzinom: Bedeutung von CA15-3/CA27.29 und CEA**

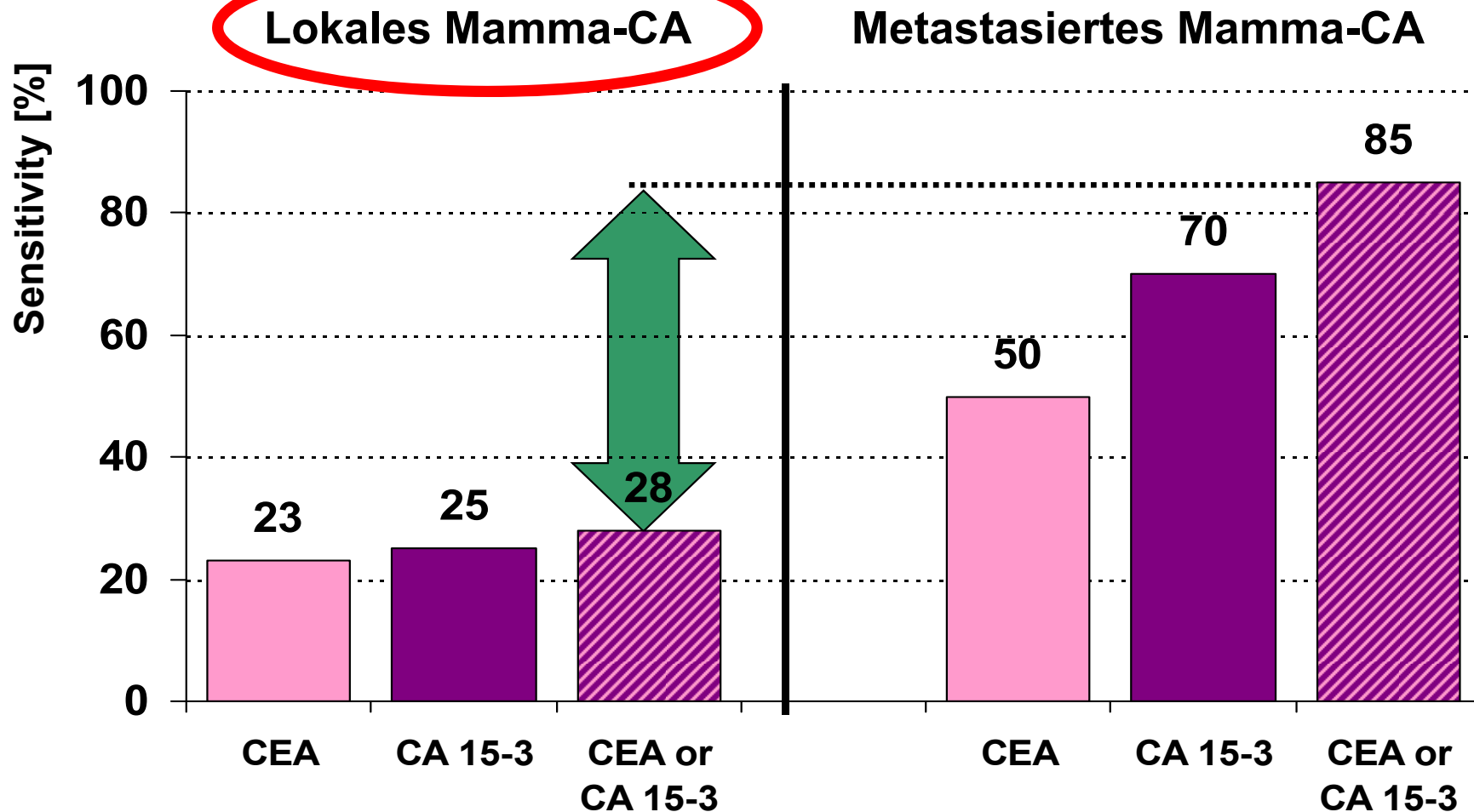
---

## **DATENLAGE (ASCO-Guidelines, R.J.Bast et al., 2007)**

- **Keine Daten zur Primärdiagnostik**
- **Erhöhung von CA15-3/CA27.29 ggf. mit ungünstiger Prognose assoziiert**
  - => Bestimmung aufgrund unklarer Datenlage nicht empfohlen**
- **Keine positiven Daten zum Therapiemonitoring in frühen Stadien**
- **„Früherkennung“ von Rezidiv/Metastasierung (ca. 5-6 Monate vor klinischer Manifestation)**
  - => Bestimmung aufgrund unklarer Konsequenzen für Krankheitsverlauf nicht empfohlen**

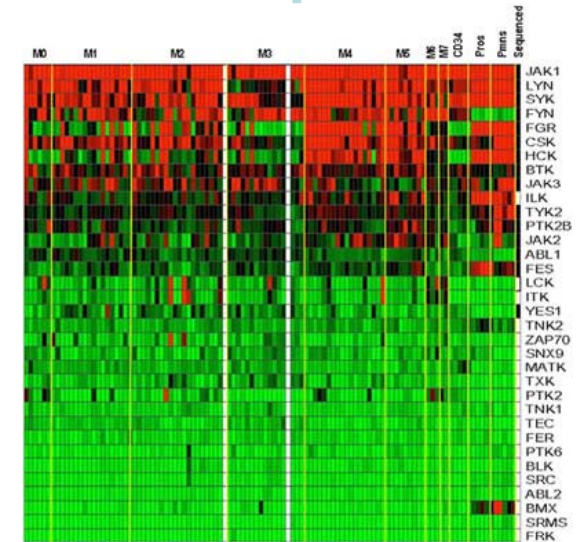
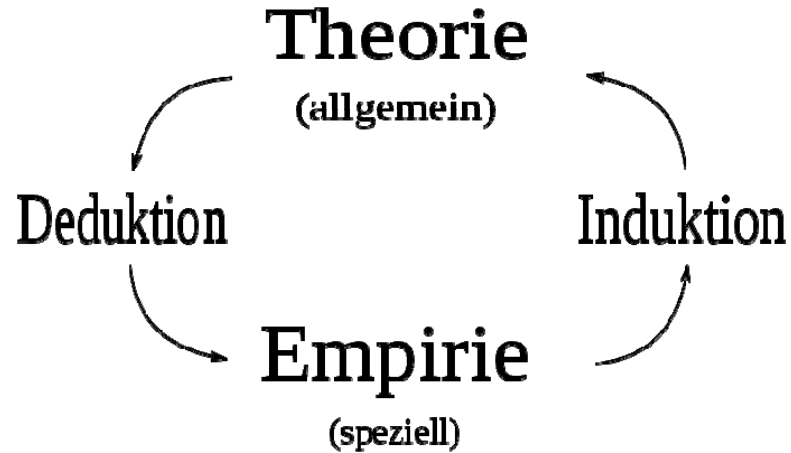
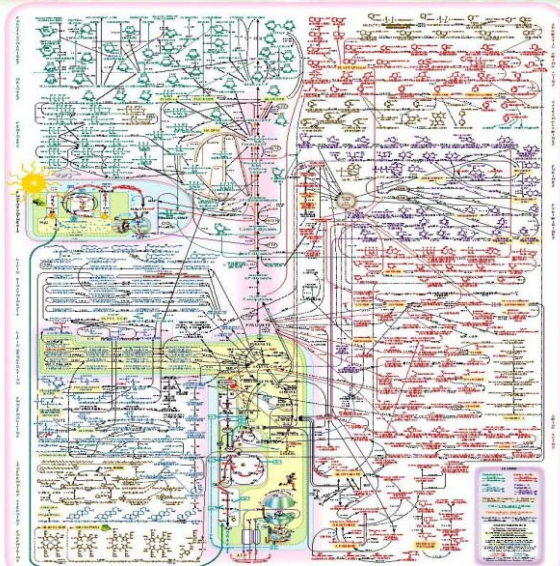
# Mammakarzinom: Bedeutung von CEA und CA 15-3

Therapiemonitoring (metastasierte Situation)  
CA15-3(CA27.29), CEA



# Wege zur Identifikation neuer Bio-Marker

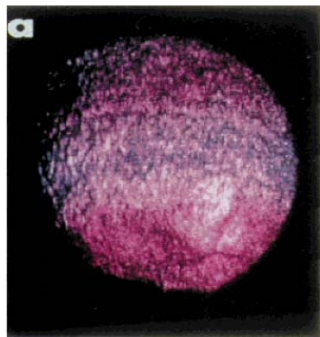
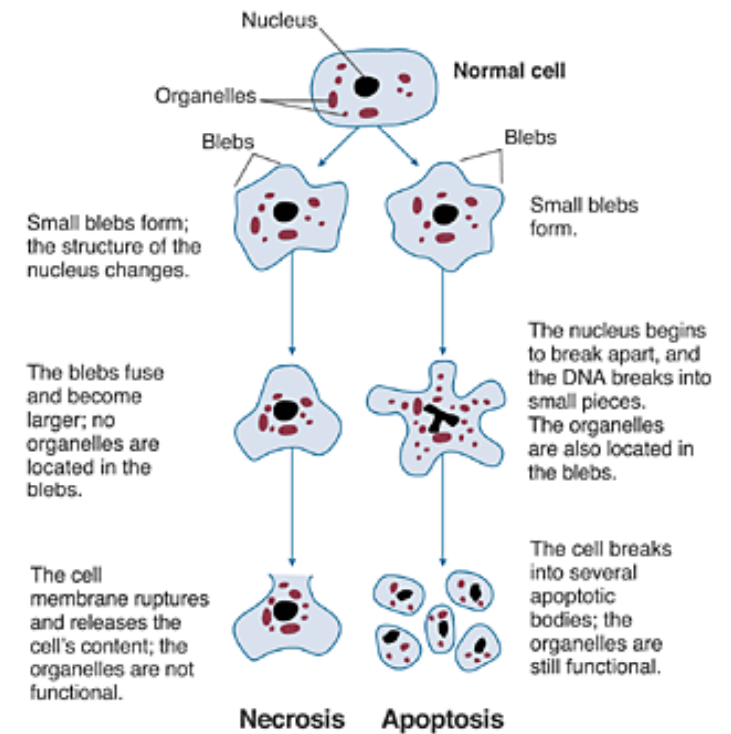
## PATHWAYS



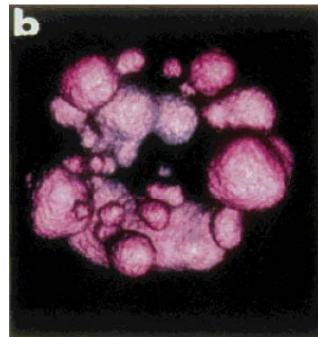
Gene Array

# Apoptose: Definition/Charakteristika

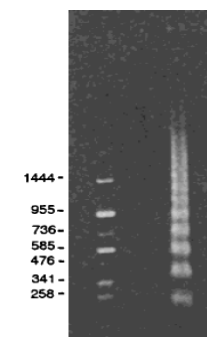
- Caspase-vermittelte Form des programmierten Zelltod
- Komplex regulierter aktiver Zelltodmechanismus (im Ggs. zur Nekrose), der durch äußere oder zellinterne Stimuli initiiert wird (z.B. Zytostatika, Antikörper, Zytokine)
- Ablauf in der Regel ohne Schädigung der Nachbargewebe
- Aktivierung von Caspasen mit subsequenter Proteindegradierung und DNA-Spaltung in nukleosomale Fragmente definierter Größe (x200bp) unter Erhalt der Zellmembran



Zellkern einer gesunden Zelle

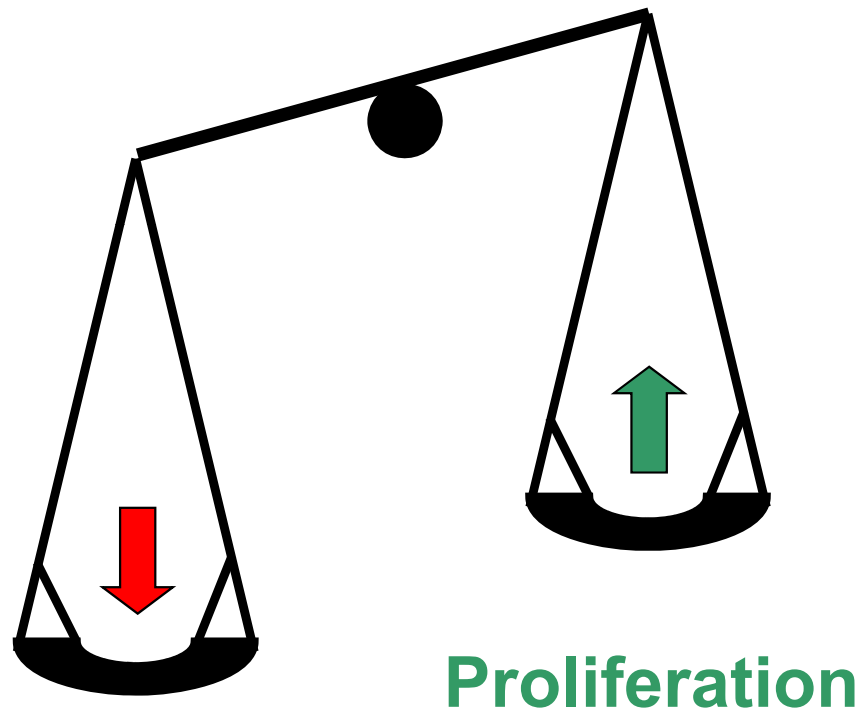


Zellkern einer apoptotischen Zelle



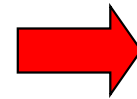
DNA-Spaltung in nukleosomale Fragmente

# Klinische Bedeutung der Apoptose



**Zelltod**

**Proliferation**



**erhöhte Zelltodrate**

Trauma

Ischämie

Infektionen / Sepsis

Degenerative Prozesse

Autoimmun-Erkrankungen

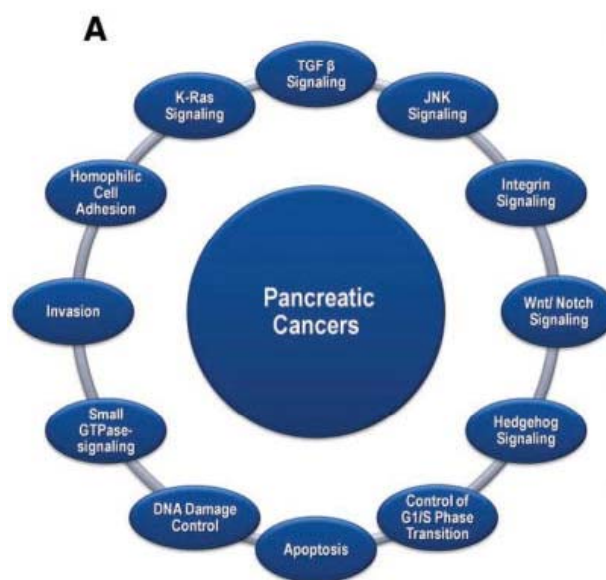
**Maligne Tumore**

● Spontan

● Therapie-induziert



# Core signaling pathways and processes genetically altered in most pancreatic cancers. B.Vogelstein; Science 2008



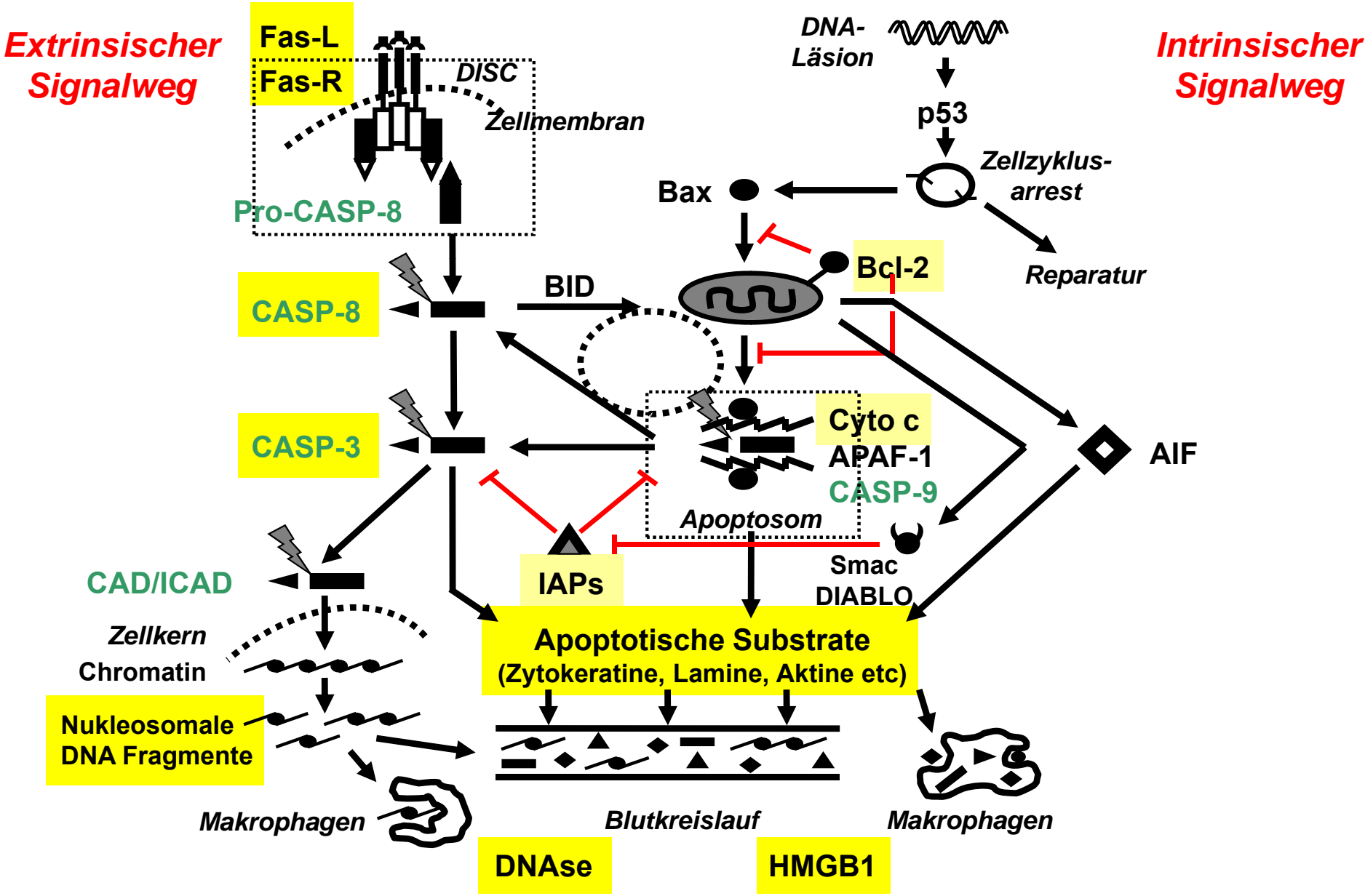
| Pathway                       | No.altered genes | Fraction |
|-------------------------------|------------------|----------|
| Apoptosis                     | 9                | 100%     |
| DNA damage control            | 9                | 83%      |
| Regulation of G1/S Ph.        | 19               | 100%     |
| Hedgehog signaling            | 19               | 100%     |
| Homophilic cell adhesion      | 30               | 79%      |
| Integrin signaling            | 24               | 67%      |
| C-Jun-N-terminal kinase sign. | 9                | 96%      |
| KRAS signaling                | 5                | 100%     |
| Regulation of invasion        | 46               | 92%      |
| Small GTP-ase dept. sign.     | 33               | 79%      |
| TGFβ                          | 37               | 100%     |
| Wnt/Notch signaling           | 29               | 100%     |

# Nachweis von Apoptoseprodukten im Serum

---

- Tumor-assoziierte nukleosomale frei zirkulierende DNA-Fragmente aus apoptotischen Zellen können im Patientenserum nachgewiesen werden (quantitative PCR, immunchemisch mittels Nukleosomen-ELISA)
- der quantitative Nachweis freier kurzer DNA-Fragmente im Serum von Mammakarzinompatientinnen korreliert mit der Krankheitsstadium und der Prognose (B.Fisher)
- Die Integrität zirkulierender DNA-Fragmente (Ratio längerer zu kürzeren DNA-Fragmente) ist bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Mamma- und Ovarialkarzinomen deutlich erhöht
- Die DNA-Integrität gemessen im Serum bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen Mammakarzinomen korreliert mit dem Lymphknotenbefall

# Signalwege der Apoptose



| Faktoren |   |
|----------|---|
| sFAS     | lösliche Form des FAS-Rezeptors, kann Apoptose durch Bindung des Liganden blockieren;<br><i>erhöhte Serum-Spiegel korrelieren neg. mit Überleben</i>  |
| M30      | erkennt eine Caspase-Spaltstelle in CK 18;<br><i>ein signifikanter M30-Anstieg nach Chemotherapiegabe scheint mit einem besseren Ansprechen zu korrelieren</i>  |
| Survivin | Inhibiert den mitochondrialen (intrinsischen) Apoptose-Pathway (inhibiert Caspasen); <i>eine Überexpression von Survivin korreliert mit Aggressivität und Chemoresistenz</i>  |
| MIF      | MIF inhibiert p53-abhängige Apoptose; <i>eine Überexpression scheint ein prinzipiell günstiger Prognosefaktor zu sein</i>   |
| HMGB-1   | Ist ein DAMP (damage associated molecular pattern); kann die TLR (Toll like Rezeptor)-Expression auf Tumorzellen fördern, die wiederum den Immunescape bedingen; <i>ein TLR4 Polymorphismus mit verminderter HMGB Bindung führt zu frühem Relapse nach Anthrazyklintherapie</i> |
| RAGE     | HMGB1 bindet an RAGE; <i>die Aktivierung von RAGE kann Chemotherapie- und Radiotherapieresistenz triggern</i>   |

# Klinische Studie

- **Titel: Monitoring von Apoptose-Produkten im Serum bei Patientinnen mit Mammakarzinomen**  
*(positives Ethikvotum vom 16.6.2008)*  
*PD Dr. Holdenrieder/ Dr.O.J.Stötzer/ Prof. C. Salat/ Dr. Hamann/ PD. Dr Braun/ Dr. von Koch/ Dr. Steinkohl/ Prof. Dr. Feller/ Prof. Dr. Heitmann/ Prof. Dr. Heinemann*
- **Einschluss von vier Gruppen von Patientinnen/Probandinnen:**
  - Gesunde Probandinnen / Patientinnen mit benignen Mammaerkrankungen
  - Patientinnen mit histologisch gesicherten Mammakarzinom, bei denen die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie vorgesehen ist
  - Patientinnen mit stanzbioptisch gesichertem Mammakarzinom, bei denen die Durchführung einer primären / neoadjuvanten systemischen Chemotherapie geplant ist
  - Patientinnen messbaren Metastasen eines Mammakarzinoms, bei denen eine neue systemische palliative Chemotherapie eingeleitet wird
- **Durchführung:**
  - Blutabnahmen vor / nach OP, Tag 1 und Tag 8 des 1. Chemotherapiezyklus, Tag 1 des 2. Chemotherapiezyklus und Ende der Therapie
  - Sofortige Serumpufferung und Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$

# Methoden

---

- **Immunochemischer Nachweis von Apoptosemarkern**
  - Nukleosomen als Apoptose-Produkte werden durch den Cell Death Detection-ELISA<sup>plus</sup> von Roche Diagnostics bestimmt.
  - Apoptose-typische Fragmente des Zytokeratin-18 werden mit Hilfe eines ELISA gegen das M30-Antigen (Peviva) nachgewiesen.
  - Die nachfolgenden Marker ebenfalls über **ELISA**-Technik: sFAS (Millipore), MIF (Millipore), Survivin (Stressgen), HMGB1 (IBL/SHINO-Test), CEA u. CA15-3
- **Molekularbiologischer Nachweis von DNA-Fragmenten**
  - Nach einer Proteindeaktivierung erfolgt eine quantitative pCR. Dabei werden kommerziell erhältliche Assays der Fa. Roche verwendet.
  - Es erfolgt ein quantitativer Nachweis kurzer (fragmentierter) DNA-Sequenzen über einen ALU basierten Primer (ALU 115) sowie einen Primer für längere DNA Sequenzen (ALU 247) mittels quantitativer PCR-Methodik.

# Fragestellung

---

- Kann durch die Bestimmung von Apoptosemarker im Serum von Patientinnen, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten, das Ansprechen vorhergesagt werden?
- Können Markerprofile identifiziert werden, die mit dem Krankheitsstadium korrelieren?

# Patientinnen

(insgesamt N = 243; bisher ausgewertet N = 119)

| <b>Patients and Controls</b>   | <b>N</b> | <b>Age</b> | <b>Histology</b>                | <b>N</b> | <b>%</b> |
|--|----------|------------|---------------------------------|----------|----------|
| Localized breast cancer  | 44       | 46,2       | Invasive ductal carcinoma       | 36       | 81,8     |
| Metastatic breast cancer   | 31       | 64,4       | Invasive lobular carcinoma      | 2        | 4,6      |
| Benign disease of the breast   | 13       | 44,7       | Adenocarcinoma                  | 2        | 4,6      |
| Healthy women  | 31       | 41,9       | unknown                         | 4        | 9,1      |
| <b>Patients with primary breast cancer treated by neoadjuvant chemotherapy</b> |          |            | <b>Neoadjuvant Chemotherapy</b> | <b>N</b> | <b>%</b> |
| <b>UICC stage before therapy</b>   | <b>N</b> | <b>%</b>   | EC                              | 6        | 13,6     |
| I  | 0        | 0          | EC + Doce                       | 23       | 52,3     |
| II   | 35       | 79,6       | EC + Doce + Pacli               | 2        | 4,6      |
| III  | 8        | 18,2       | EC + Pacli                      | 11       | 25       |
| not known  | 1        | 2,3        | EC/5FU + Doce                   | 2        | 4,6      |
| <b>UICC stage after therapy</b>  | <b>N</b> | <b>%</b>   | <b>Response to the therapy</b>  | <b>N</b> | <b>%</b> |
| no residual tumor detectable   | 8        | 18,2       | Response (R)                    | 31       | 70,5     |
| I  | 9        | 20,5       | Non-Response (NR)               | 13       | 29,6     |
| II   | 18       | 40,9       |                                 |          |          |
| III  | 9        | 20,5       |                                 |          |          |



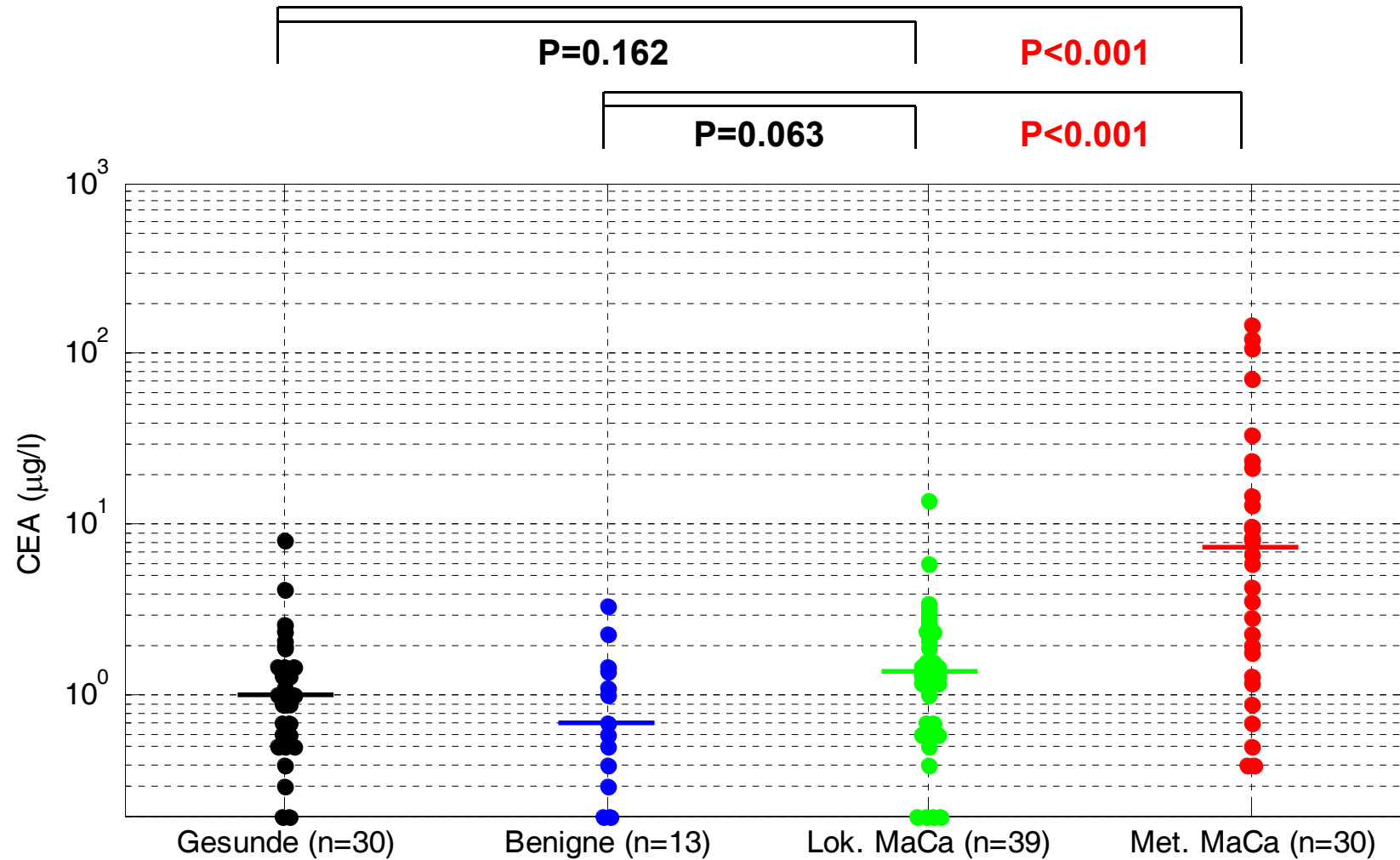
# Ergebnisse Diagnostik

---

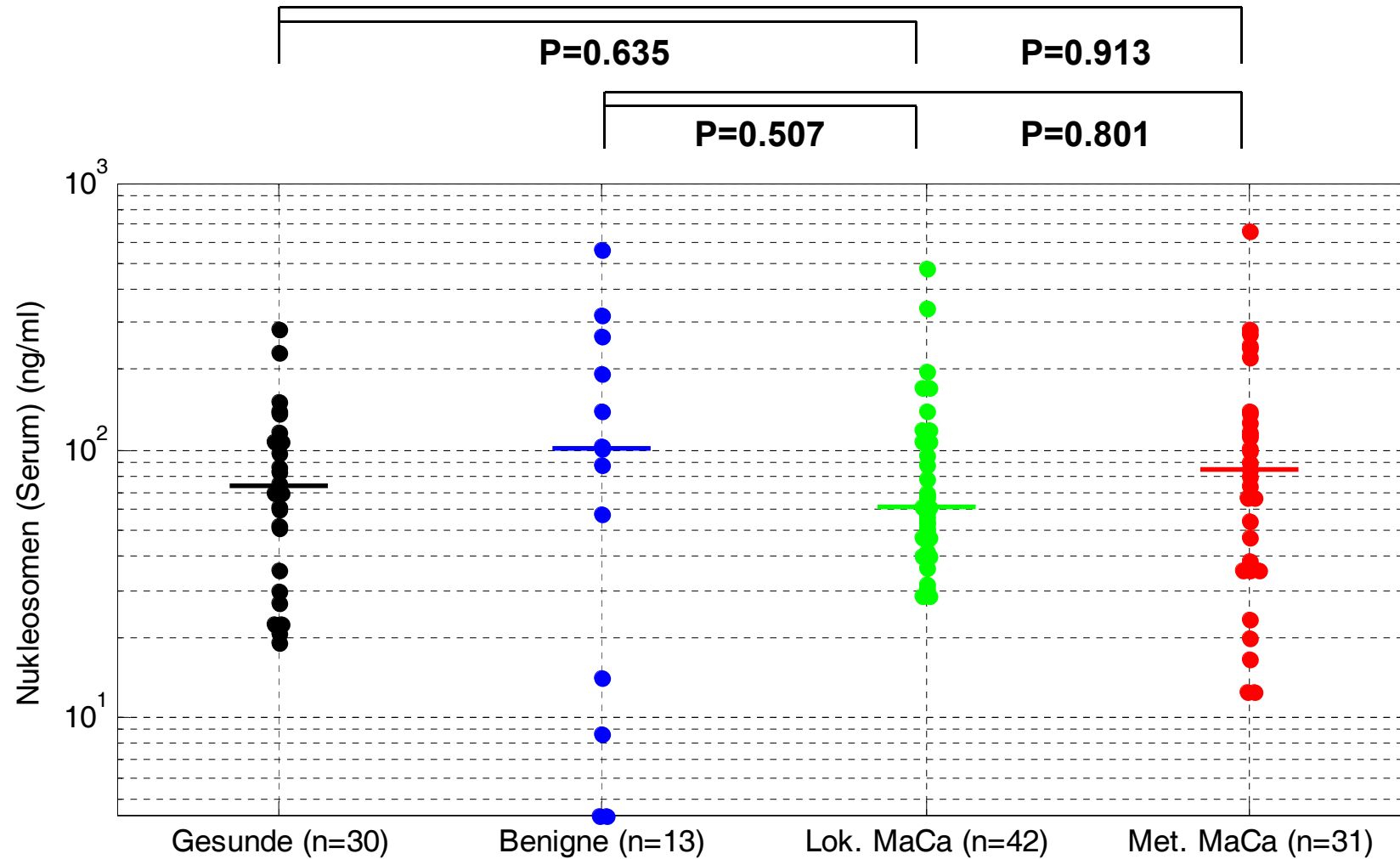
**Gesunde Probanden v.s.  
Pat. mit benignen Erkrankungen vs.  
Pat. mit Mamma-CA lokal fortgeschritten vs.  
vs. Pat. mit Mamma-CA metastasiert**

**Zwischenanalyse**

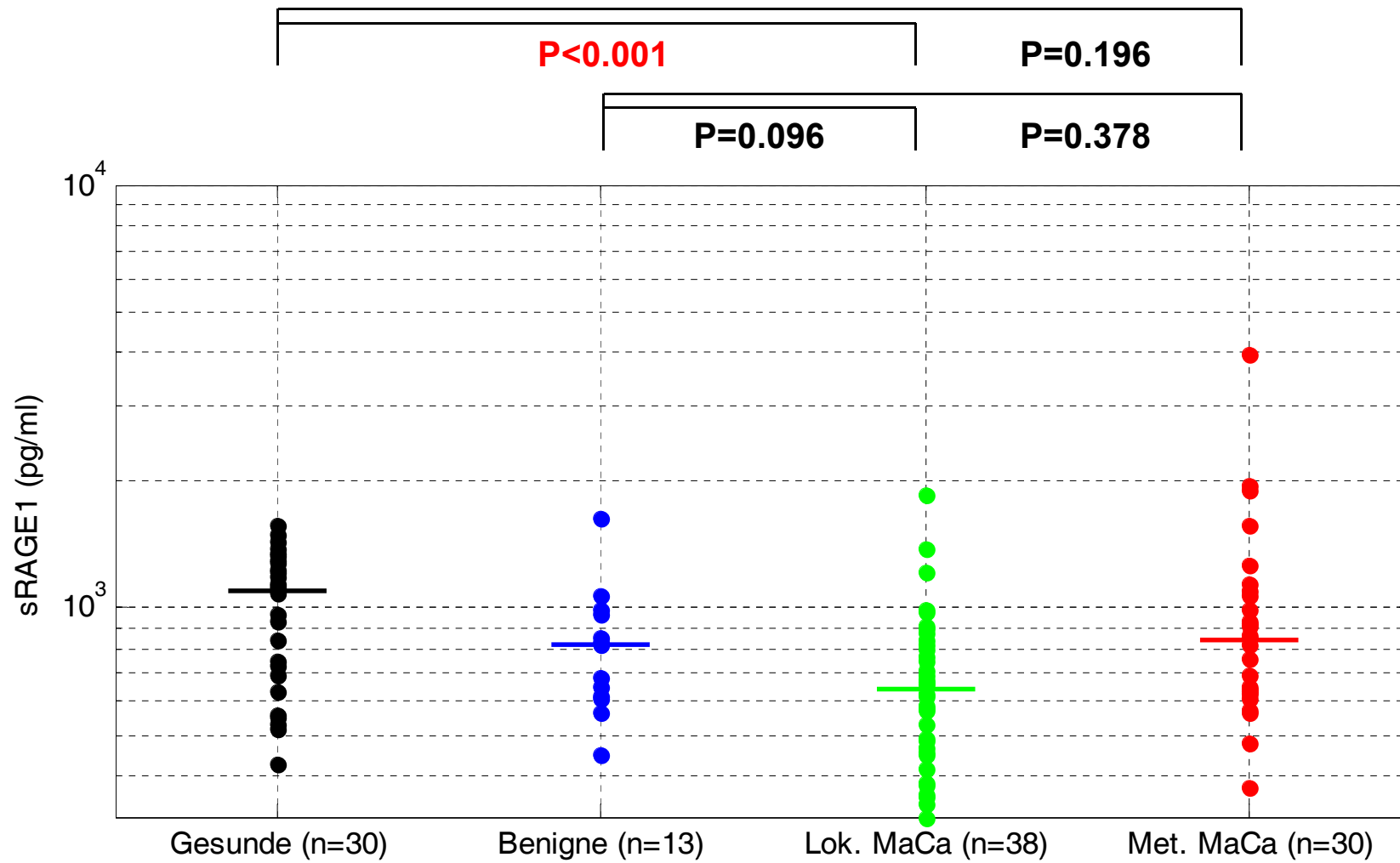
# Werteverteilung CEA



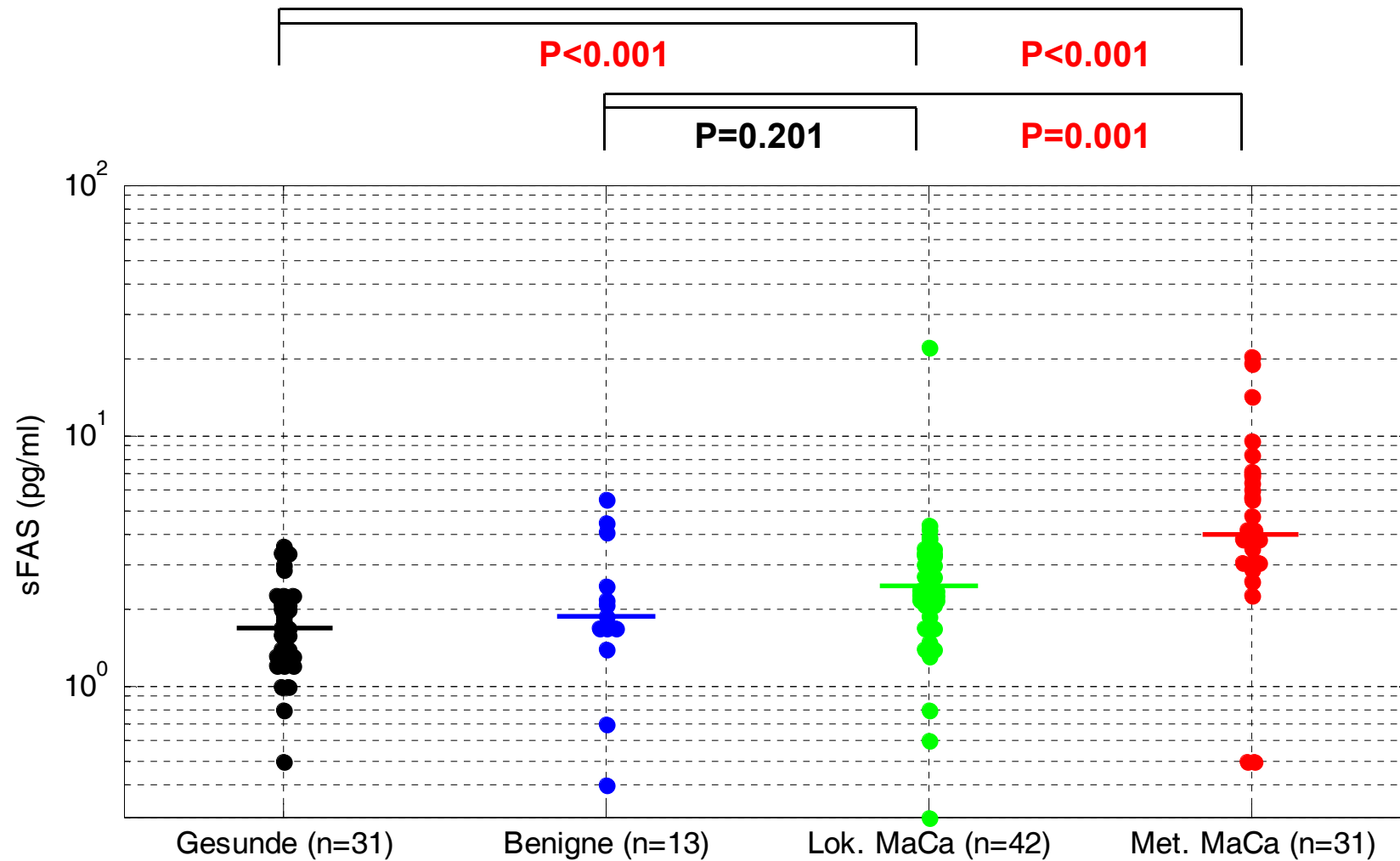
# Werteverteilung Nukleosomen (Serum)



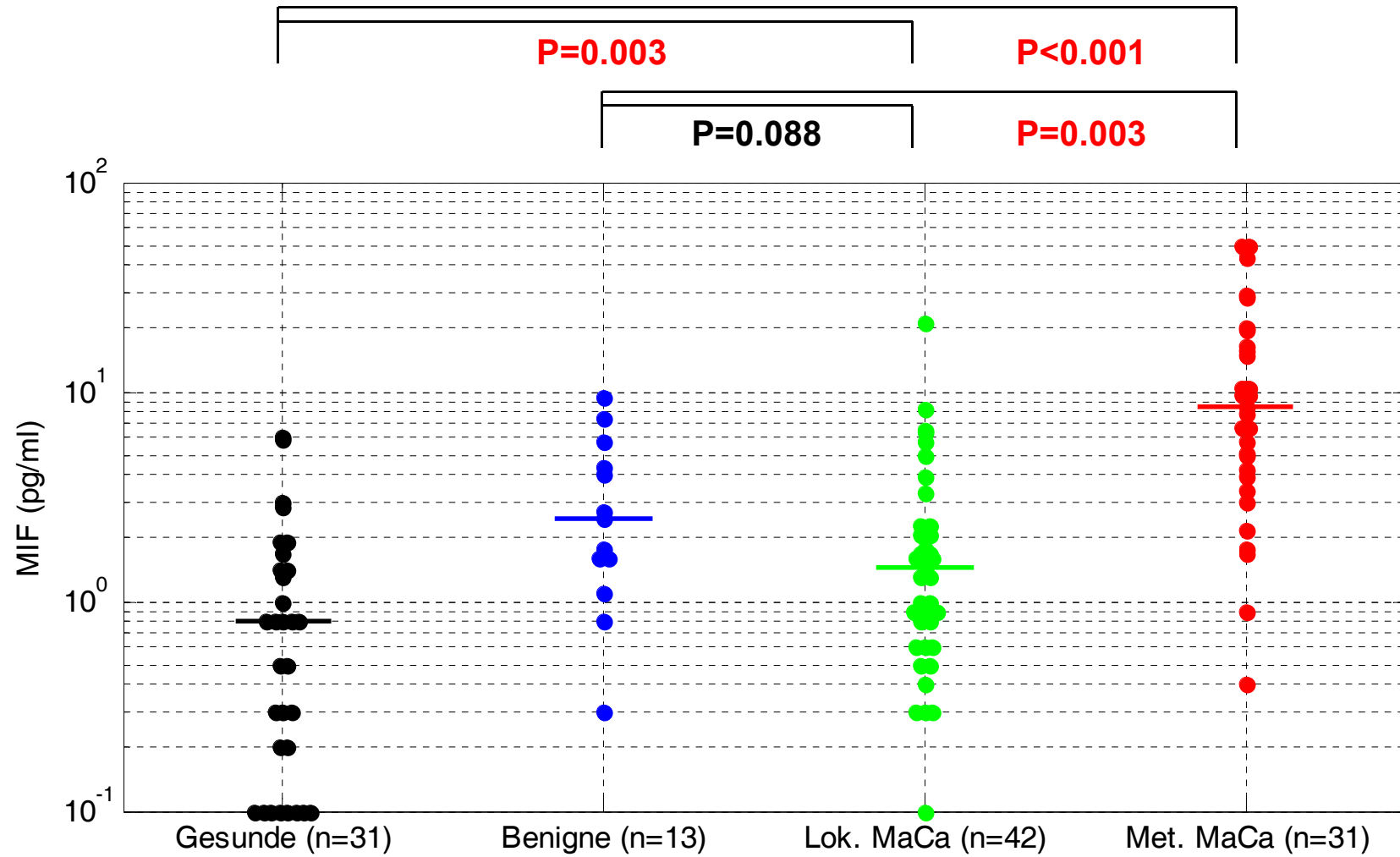
# Werteverteilung sRAGE



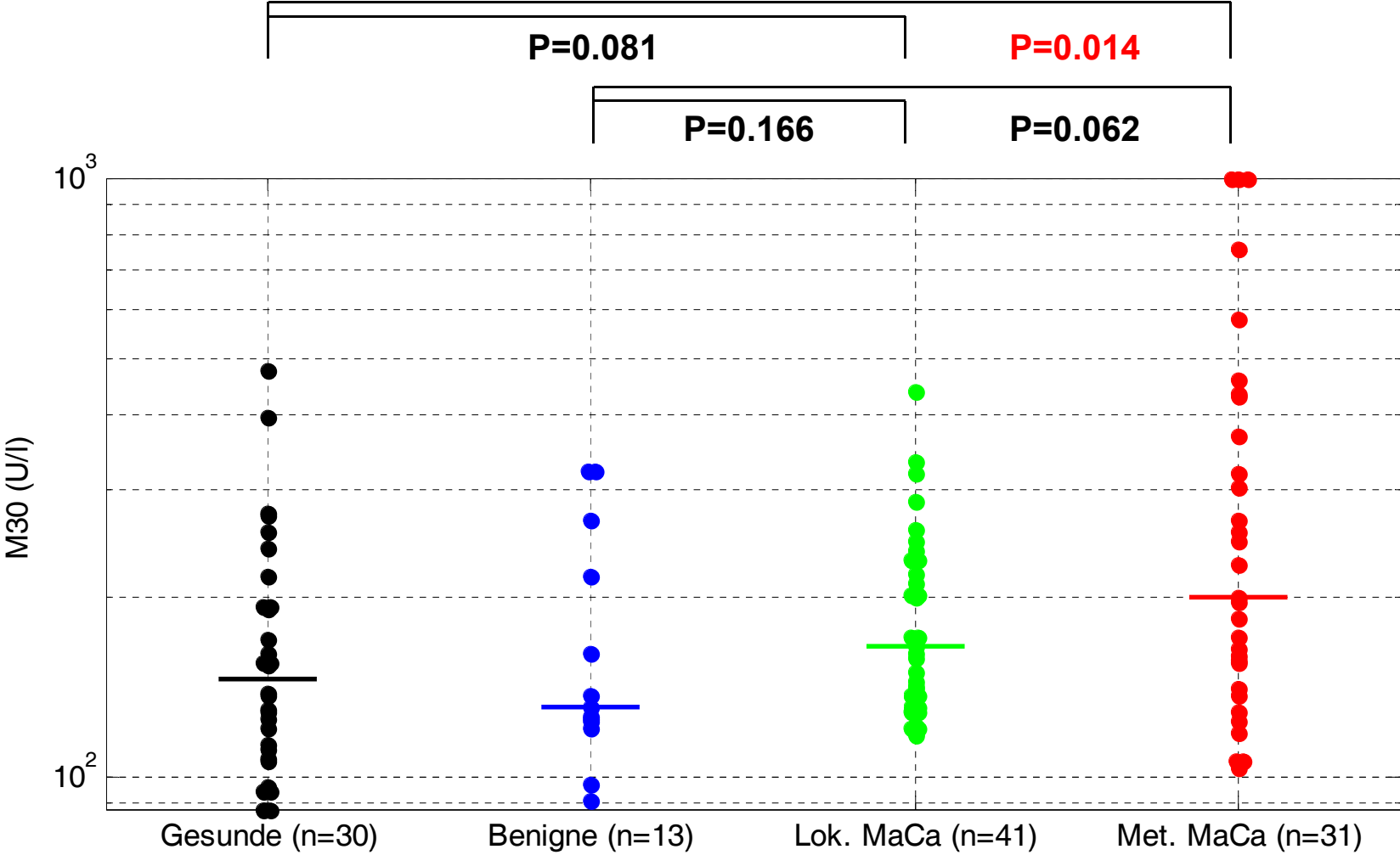
# Werteverteilung sFAS



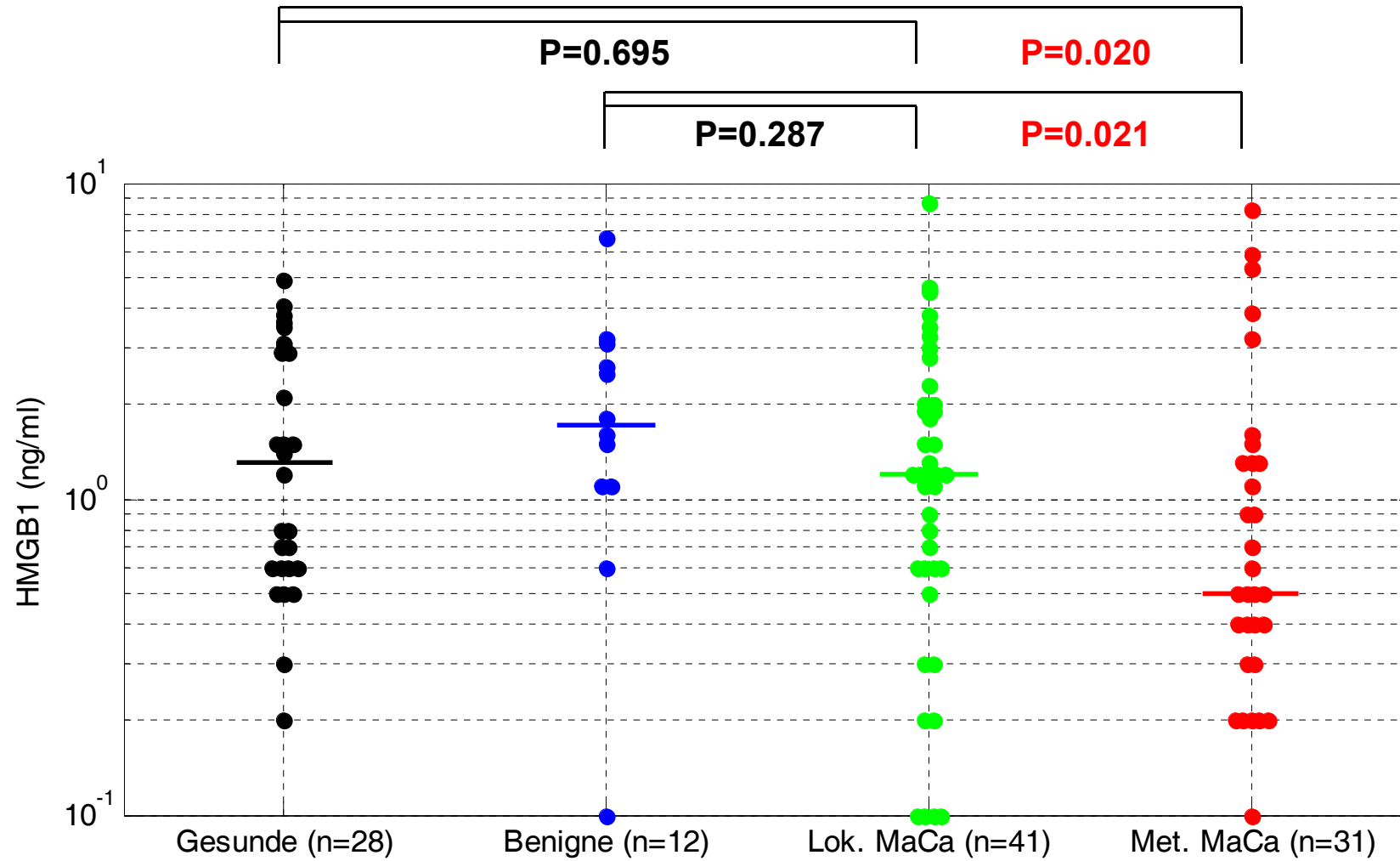
# Werteverteilung MIF



# Werteverteilung M30-Antigen



# Werteverteilung HMGB1

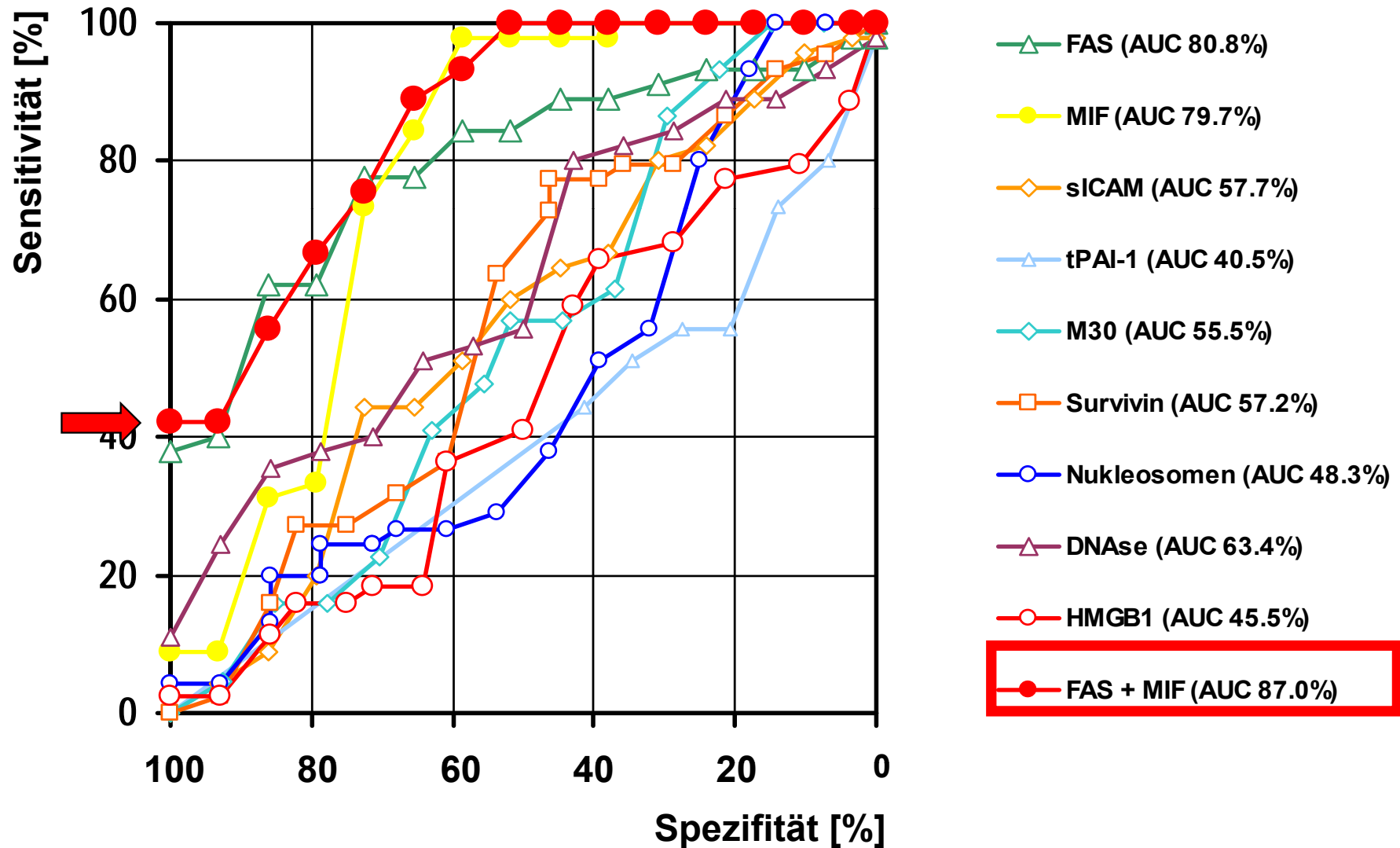




# Zusammenfassung

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| gesunde Probandinnen           | <b>RAGE</b> ↑   |
| Gesunde Probandinnen           | <b>RAGE</b> ↑   |
| Pat. mit benignen Erkrankungen | Nukleosomen↑<br><b>MIF</b> ↑↑↑  |
| lokales Mammakarzinom          | <b>MIF</b> ↑↑<br><b>FAS</b> ↑↑<br><b>M30</b> ↑<br><b>RAGE</b> ↓   |
| metastasiertes Mammakarzinom   | <b>MIF</b> ↑↑↑<br>Survivin↑↑<br><b>FAS</b> ↑↑↑<br><b>M30</b> ↑↑<br><b>CEA</b> ↑↑↑<br><b>CA15.3</b> ↑↑↑<br>Nukleosomen↑<br><b>HMGB1</b> ↓↓ |

# ROC Kurven Diagnose lokales Mamma-CA

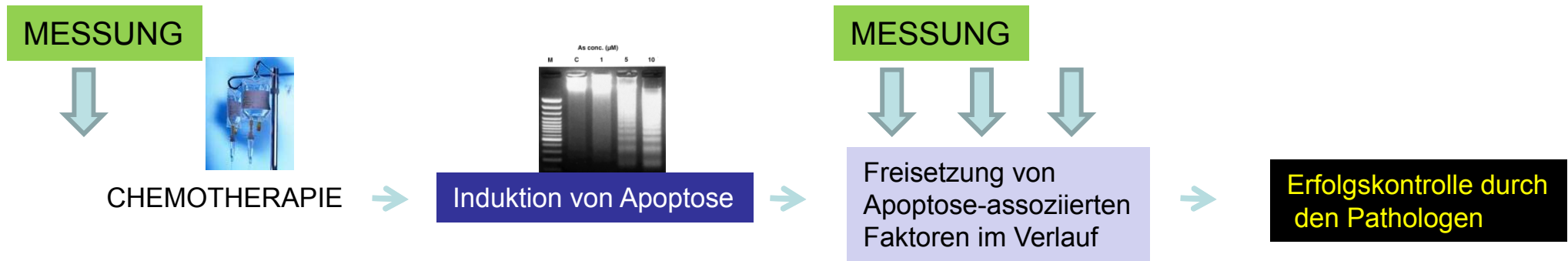


# Zusammenfassung DIAGNOSTIK

---

- Bzgl. des Nachweises von RAGE, Nukleosomen, MIF, M30, Fas, HMGB1 und Survivin finden sich zum Teil signifikante Unterschiede in den unterschiedlichen Kohorten (gesund, benigne, MC lokal, MC metastasiert)
- Die Spezifität und Sensitivität des Markerpanels übertrifft die von CEA und CA15 in allen Gruppen mit Ausnahme der metastasierten Gruppe deutlich.
- Die Anzahl der gesunden Probandinnen und der Patientinnen mit benignen Erkrankungen ist noch zu klein (und zu heterogen), Keine Pat. in der Nachsorge

# Prädiktion von Therapieansprechen im neoadjuvanten Therapieansatz

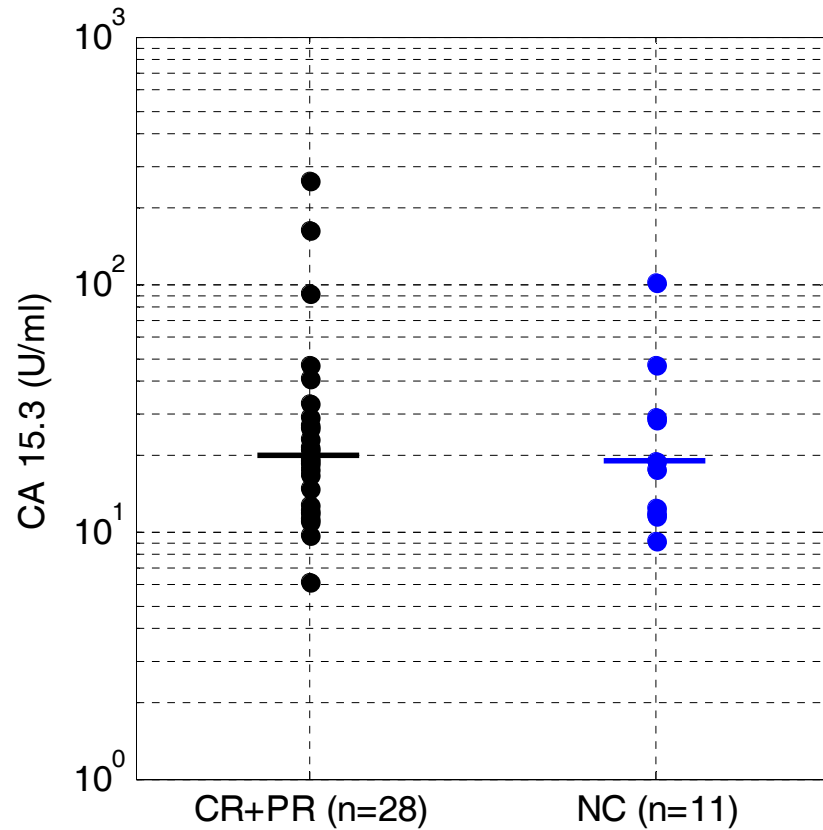


- Welche Patientinnen sprechen nicht gut auf die Therapie an (Prädiktion Non-Response)?
- Welche erreichen mglw. eine komplette Remission?

# Therapieansprechen CA 15-3

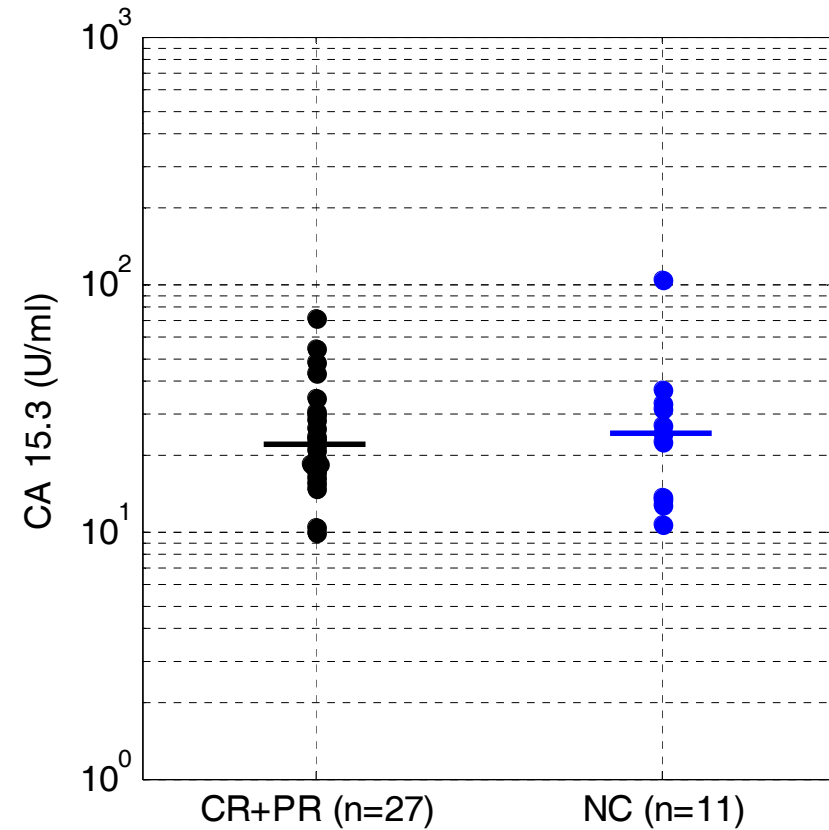
Basiswert vor dem 1. Zyklus

P=0.852



Basiswert vor dem 2. Zyklus

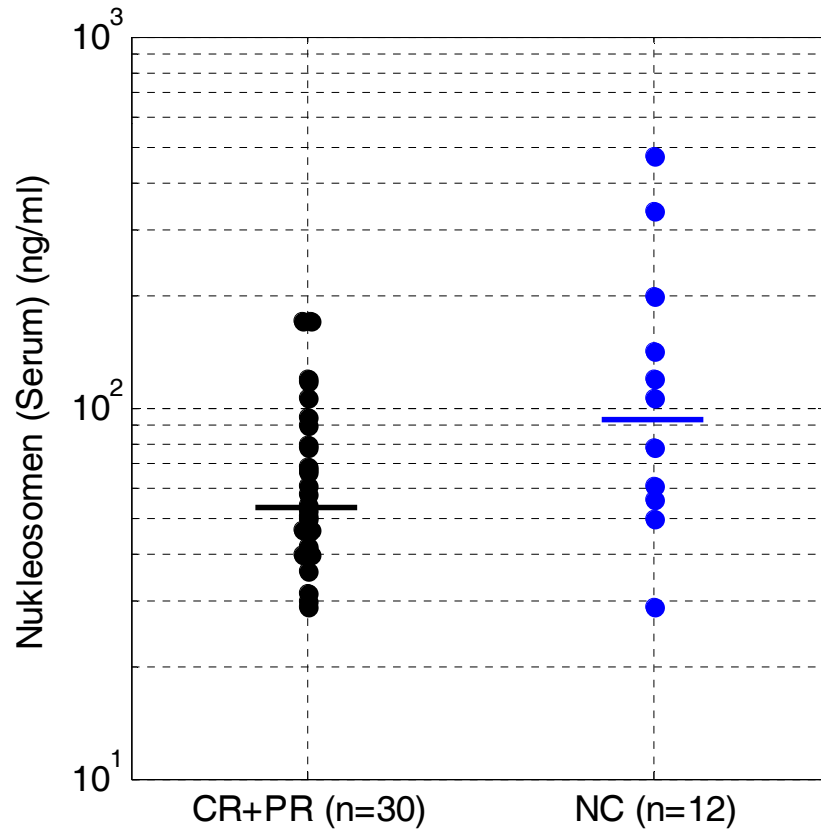
P=0.949



# Therapieansprechen Nukleosomen (Serum)

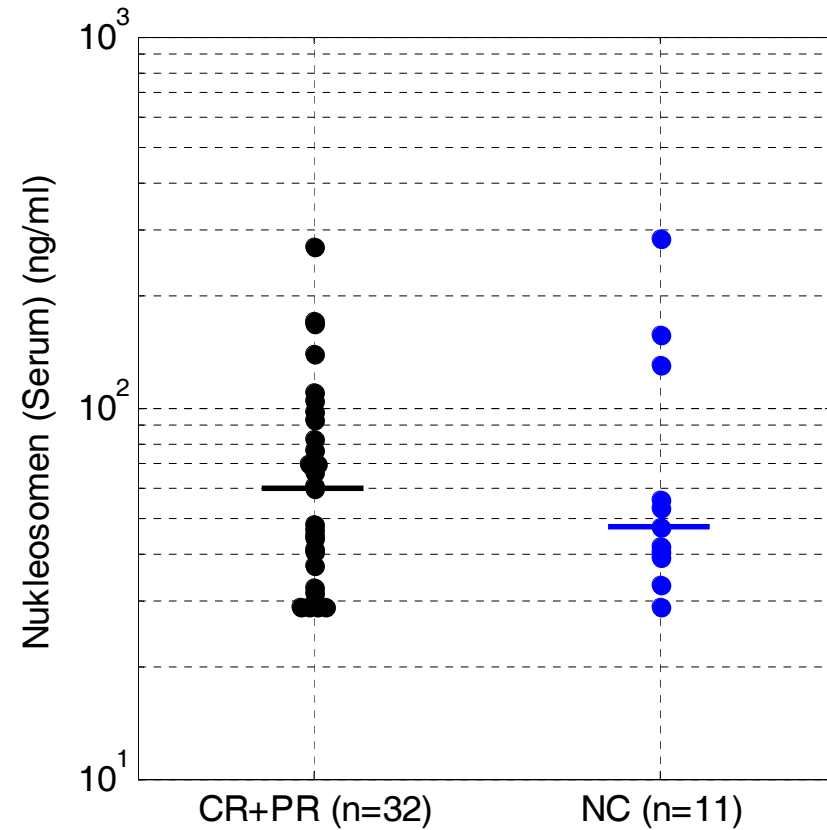
Basiswert vor dem 1. Zyklus

**P=0.038**



Basiswert vor dem 2. Zyklus

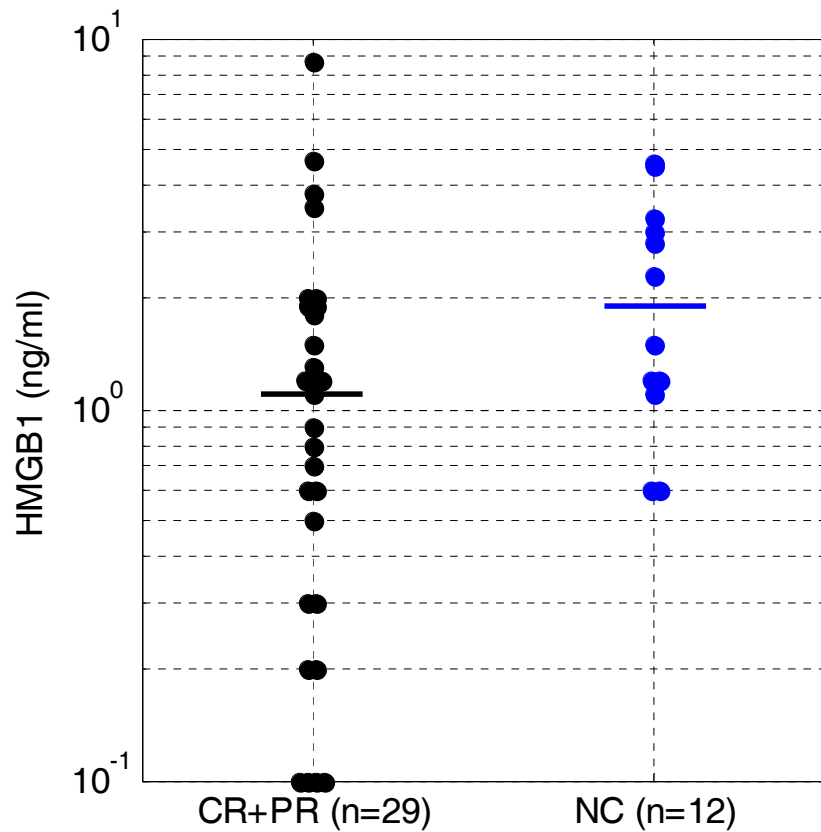
**P=0.867**



# Therapieansprechen HMGB1

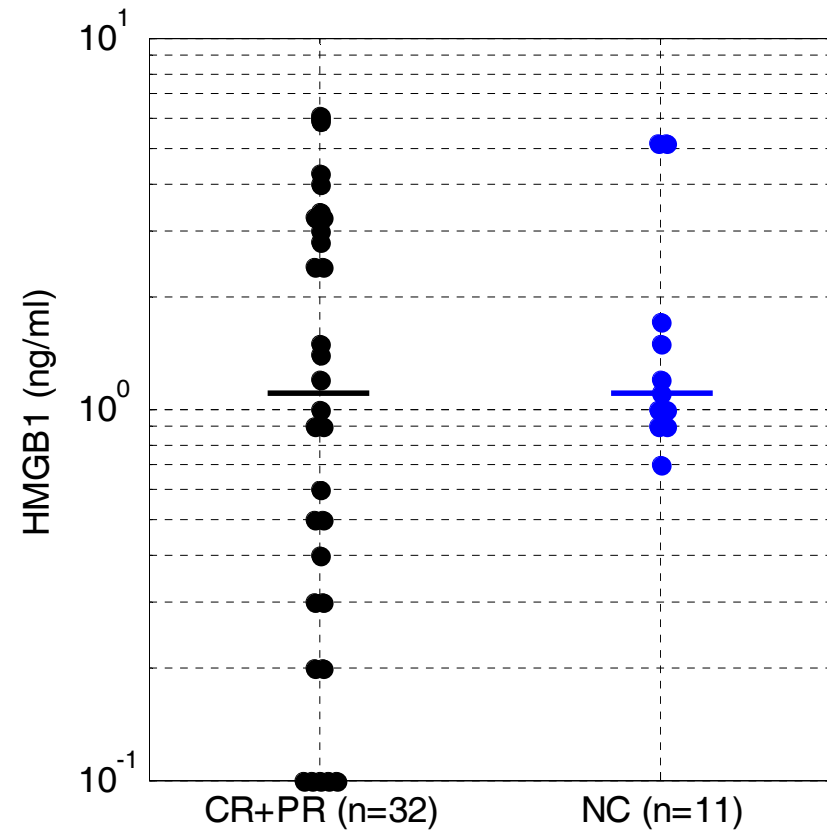
Basiswert vor dem 1. Zyklus

**P=0.054**



Basiswert vor dem 2. Zyklus

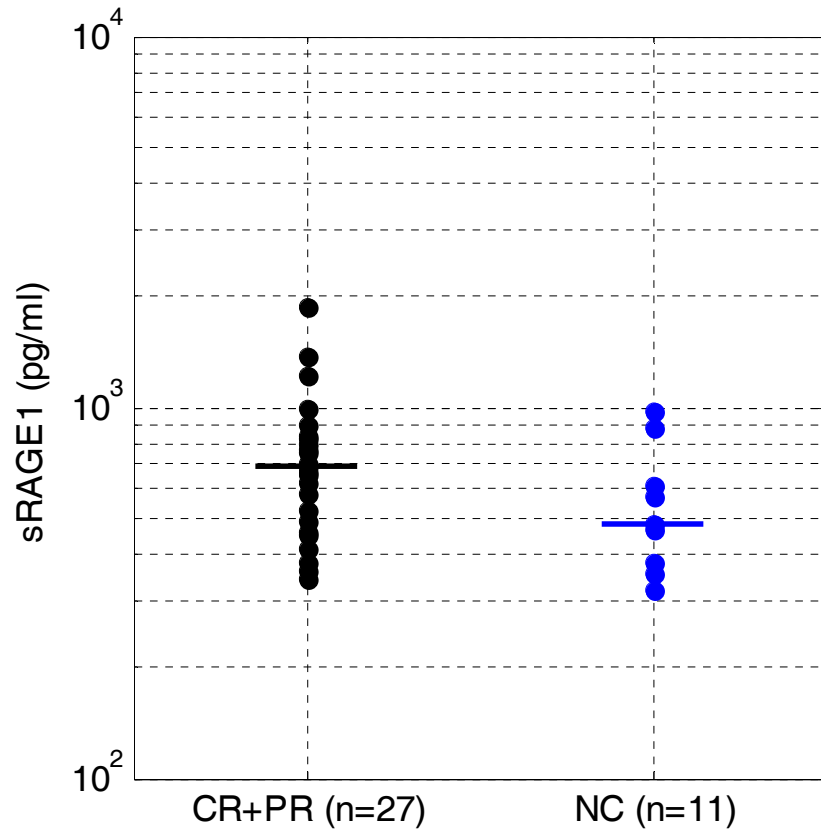
**P=0.512**



# Therapieansprechen sRAGE

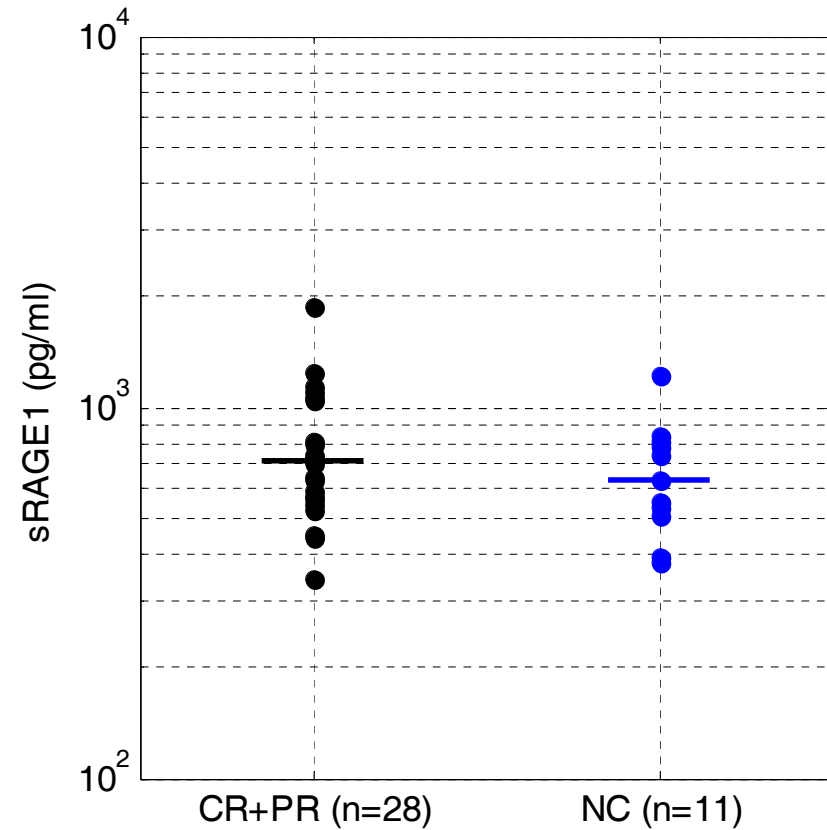
Basiswert vor dem 1. Zyklus

**P=0.054**



Basiswert vor dem 2. Zyklus

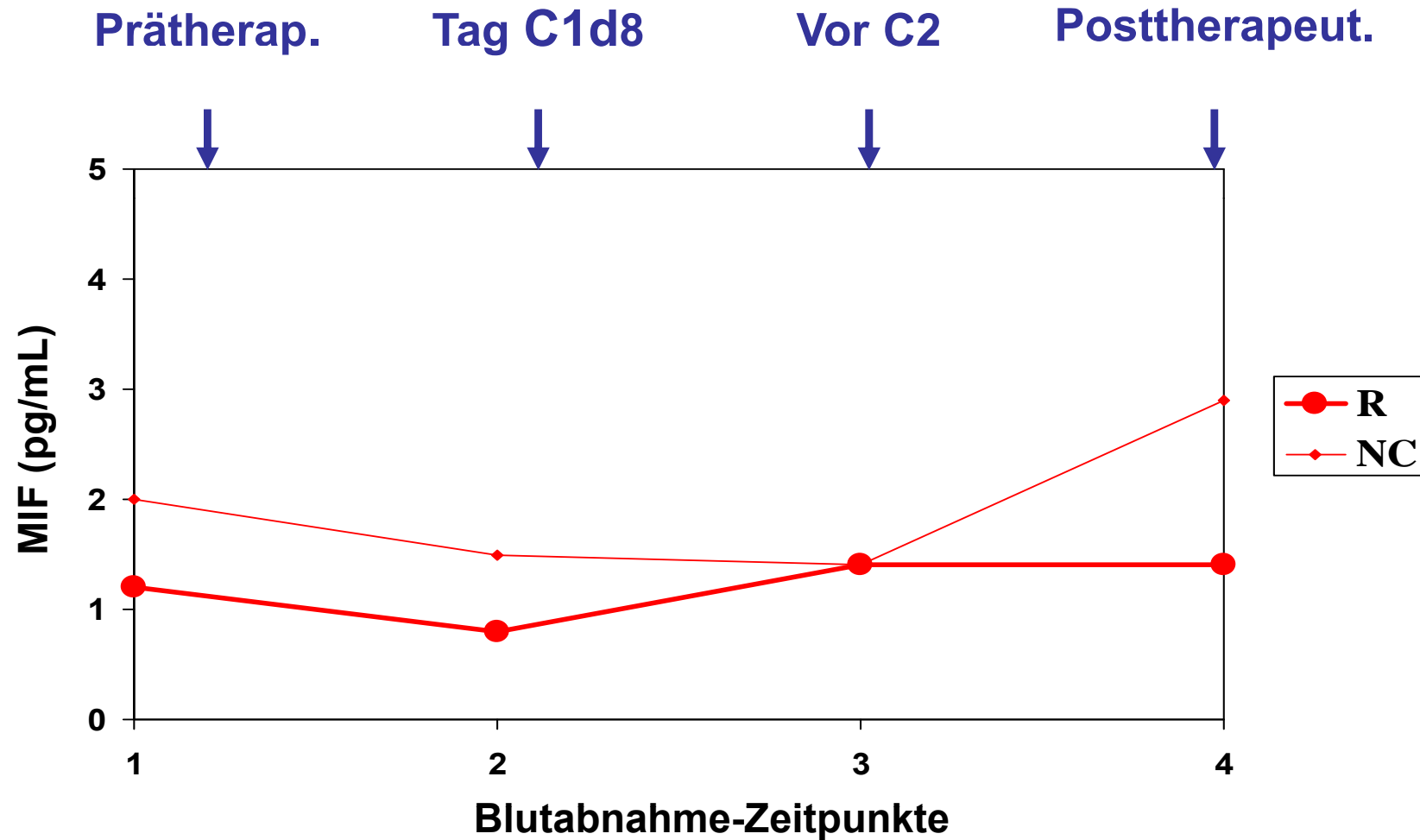
**P=0.374**



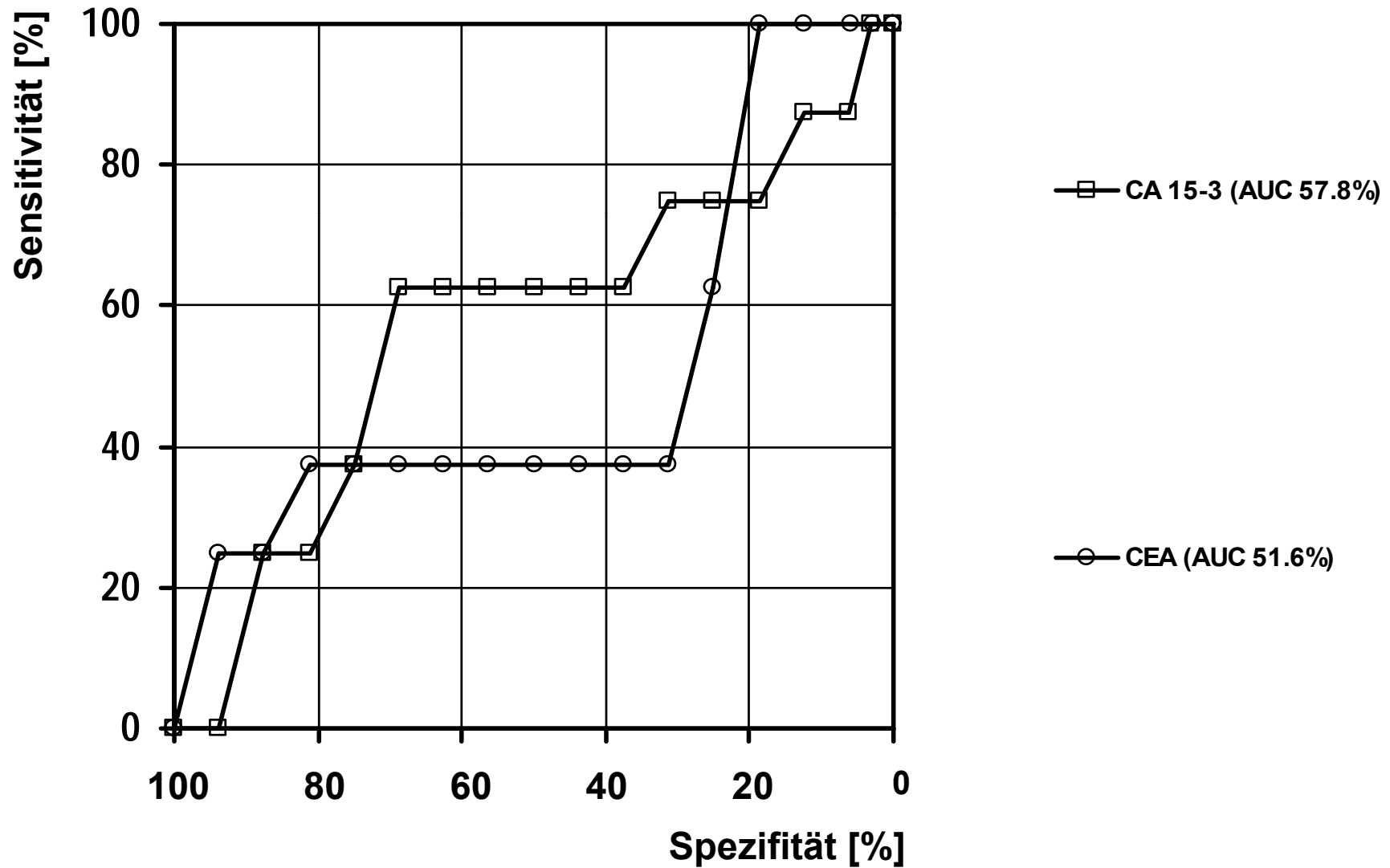


# Estimation of Therapy Efficacy

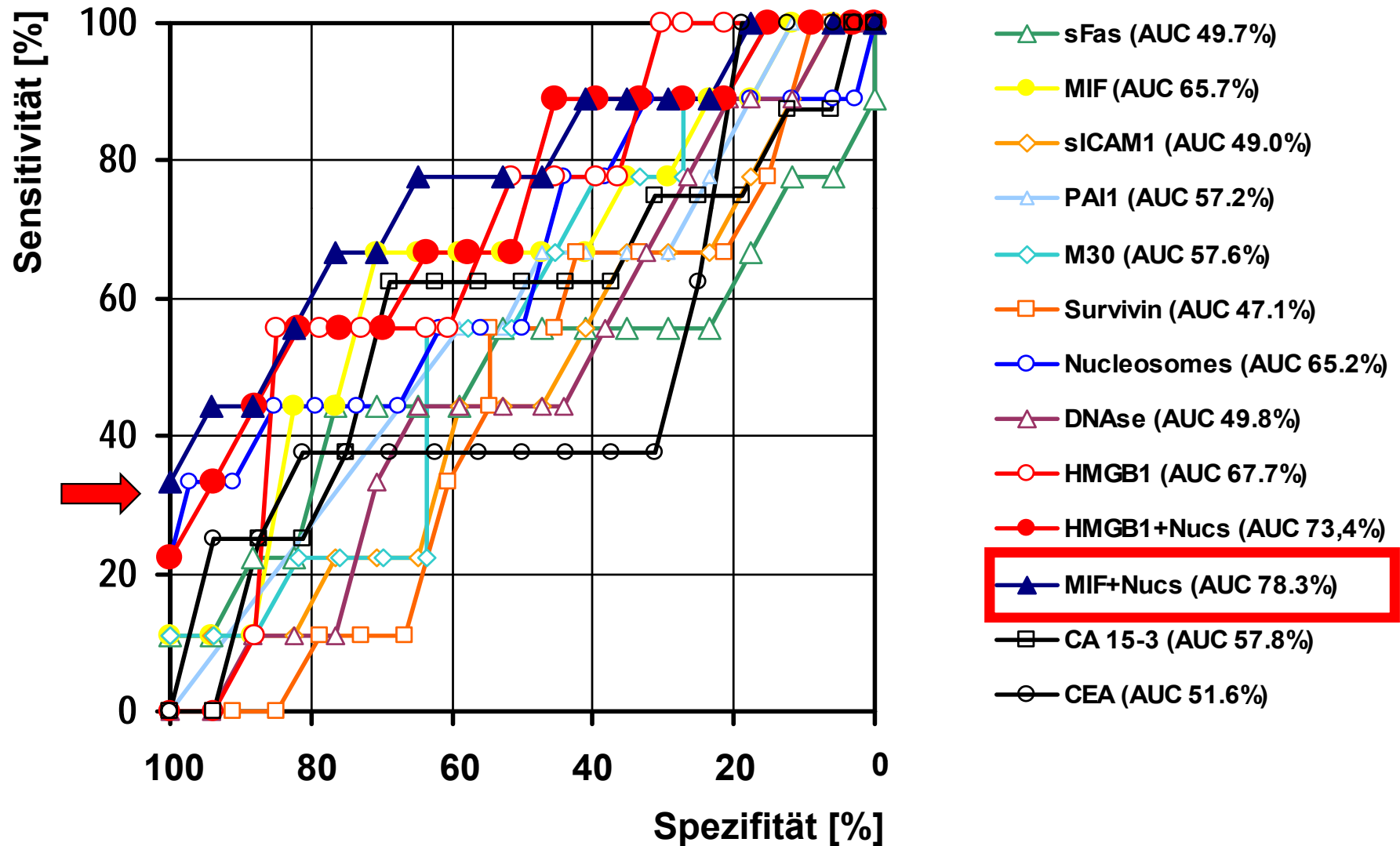
MIF Verlauf (Mediane), R=CR+PR, NC=NC



# ROC Kurven Therapieansprechen (Prädiktion NON-Response)



# ROC Kurven Therapieansprechen



# Prädiktion von Therapieansprechen im neoadjuvanten Therapieansatz

---

- die prätherapeutische Bestimmung von MIF, HMGB1, M30 und Nukleosomen kann zwischen der Gruppe der Responder (CR und PR) und der Nicht- Responder diskriminieren
- für eine frühe Identifizierung der Patientinnen, bei denen eine pCR erreicht wird, eignet sich besonders der Nachweis von RAGE

# Fazit

---

Durch die Bestimmung zirkulierender Apoptosemarker im Patientenserum können zusätzliche Informationen zur Differential/Ausbreitungsdiagnostik und zur Responseeinschätzung gewonnen werden. Die vorliegenden Daten sind aber aufgrund der geringen Fallzahlen nicht ausreichend und müssen an einem größeren Patientinnenkollektiv überprüft werden.

# Ausblick

---

- Einschluss weiterer Patientinnen in die laufende Studie und Datenauswertung (gesunde Probandinnen, Patientinnen mit benignen Mamma-Tumoren, in adjuvanter Situation, Nachsorge, Rezidivsituation, metastasierter Situation), Berücksichtigung weiterer klinischer Daten
- Aufnahme weiterer Apoptose-assoziiierter Marker
- Korrelation mit Markerveränderungen im Tumorgewebe (Vgl. Stanzbiopsie/Histologie)
- Untersuchung Interaktion von HMGB-1/RAGE mit dem Immunsystem (Kooperation Fr.Prof.Dr.H.Schmetzer)

# Das Team

---

- PD Dr. Stefan Holdenrieder<sup>1,2</sup>, Debora Fersching<sup>1</sup>, Barbara Siegele<sup>1</sup>, Dr. Dorothea Nagel<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie, Klinikum der LMU Großhadern,  
<sup>2</sup>Institut für Klin. Chemie und klin. Pharmakologie,  
Universität Bonn
- Dr. U. Hamann, PD Dr. Braun, Frauenklinik Taxisstraße
- Dr. von Koch, Dr. Steinkohl, Brustzentrum Klinikum 3. Orden
- Prof. Dr. A.-M. Feller, Prof. Dr. C. Heitmann, Brustzentrum am Englischen Garten
- Prof. Dr. C. Salat und unser gesamtes Praxisteam
- Prof. Dr. V. Heinemann, Prof. Dr. W. Hiddemann, Medizinische Klinik und Poliklinik III der LMU, Klinikum Großhadern