

Molekulargenetische und zytogenetische Diagnostik/ Molecular-Genetic and Cytogenetic Diagnostics

Redaktion: H.-G. Klein

Arne Pfeufer, Barbara Dockhorn-Dworniczak, Peter Findeisen, Georg Hoffmann, Michael Kiehntopf, Hanns-Georg Klein und Daniel Teupser*

12. Jahrestagung der Sektion Molekulare Diagnostik der DGKL am 6. und 7. Juni 2013 in der Evangelischen Akademie Tutzing

Report on the 12th Annual Meeting of the Section of Molecular Diagnostics of the DGKL on 6th/7th June 2013 in Tutzing

Zusammenfassung: Die diesjährige 12. Jahrestagung der Sektion Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) stand unter dem Leitthema „Molekulare Signaturen“ und fand vom 06.–07.06.2013 in Tutzing statt. Molekulare Signaturen ergeben sich aus der Bewertung mehrerer gleichzeitig bestimmter Biomarker mit dem Ziel einer verbesserten Prävention und gezielteren Therapie von Erkrankungen. Mit diesem zentralen Aspekt der personalisierten Medizin befassten sich die vier Arbeitsgruppen der Sektion Molekulare Diagnostik aus ihren jeweiligen Blickwinkeln: Der Fokus der einführenden Sitzung der Arbeitsgruppe Genomics aus der Sichtweise der Pathologie und Laboratoriumsmedizin lag auf onkologischen Fragestellungen. In der darauf folgenden Sitzung widmet sich die Arbeitsgruppe Biobanken der Erhebung molekularer Signaturen aus archivierten Geweben und Körperflüssigkeiten. Die Arbeitsgruppe Bioinformatik ging der Frage nach, wie viele Biomarker man konkret für eine aussagekräftige Signatur benötigt. In der abschließenden Sitzung der Arbeitsgruppe Proteomics/Metabolomics wurden diese Erkenntnisse auf der Metabolitenebene am Beispiel endokrinologischer und maligner Erkrankungen in die Praxis übersetzt.

Im Rahmen der Jahrestagung fand eine Übergabe des Vorsitzes von *Michael Neumeier* (Heidelberg-Mannheim), der die Sektion seit ihrer Gründung geleitet hatte, an *Daniel Teupser* (München) statt. An dieser Stelle möchten die Autoren Herrn Professor Neumeier ihren tiefempfundenen Dank für den Aufbau und die sehr erfolgreiche Leitung der Sektion in den zurückliegenden Jahren aussprechen. Ihm ist es gelungen, die Molekulare Diagnostik als Zukunftsgebiet weit über die Grenzen der

Fachgesellschaft hinaus bekannt zu machen. Dies wird auch aus dem fachübergreifenden Rednerspektrum der diesjährigen Tagung evident.

Schlüsselwörter: Sektion; Molekulare Diagnostik; Bericht; Genomics; Biobanken; Bioinformatik; Proteomics; Metabolomics; Arbeitsgruppe.

***Korrespondenz:** Daniel Teupser, Institut für Laboratoriumsmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München, Marchioninistr. 15, 81377 München, Tel.: +49 89 7095 3211, Fax: +49 89 7095 8888, E-Mail: daniel.teupser@med.uni-muenchen.de

Arne Pfeufer: Institut für Humangenetik, Helmholtz-Zentrum München, München, Deutschland

Barbara Dockhorn-Dworniczak: Zentrum für Pathologie Kempten, Kempten, Deutschland

Peter Findeisen: Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Mannheim, Mannheim, Deutschland

Georg Hoffmann: Trillium GmbH, Grafrath, Deutschland

Michael Kiehntopf: Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Universitätsklinikum Jena, Jena, Deutschland

Hanns-Georg Klein: Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik, Martinsried, Deutschland

Arbeitsgruppe Genomics

Die Sitzung der Arbeitsgruppe Genomics wurde von *Barbara Dockhorn-Dworniczak* mit Beiträgen aus der Pathologie organisiert. In einer kurzen Einführung berichtete Frau Dockhorn-Dworniczak über die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen bei Krebs, die weltweit derzeit auf 13 Mio. und im Jahr 2030 auf 21 Mio. geschätzt wird.

Das Thema „Personalisierte Medizin-Fortschritt oder falsches Versprechen“ wurde im Zusammenhang mit individualisierten Therapieansätzen bei der Behandlung von Krebsleiden vom Deutschen Ärzteblatt 2011 auf die Titelseite gebracht und mit einem kritischen Artikel gewürdigt. Umso wichtiger sei es, sich kontinuierlich mit den neuen Entwicklungen zu befassen und den eigenen Standort immer wieder zu überprüfen. Zweifelsohne wurden in den vergangenen Jahren wichtige Inhibitoren des Tumorstroms entwickelt und auf den Markt gebracht, deren Einsatz häufig von einer exakten molekularen Diagnose abhängt. Als Beispiele seien genannt: MEKi (AZD6244), PI3Ki (LY294002), EGFRi (Gefitinib), EGFi (Cetuximab und Panitumumab), BRAFi (Vemurafenib, RG7204 or PLX4032) sowie der kombinierte BRAFi und CRAFi (Sorafenib).

Im ersten Vortrag berichtete *Reinhold Schäfer* (Institut für Pathologie, Charité Berlin) über die **Entwicklung rationaler Krebstherapien auf der Grundlage komplexer Genomdaten**. Der Anfang der rationalen Krebstherapie sei der speziell gegen das BCR-ABL Genprodukt entwickelte ABL-Kinaseinhibitor STI571 (Gleevec) gewesen. Derzeit versuche man, neue drugtargets (Kinasen, aber auch andere Proteine) durch die Modellierung von Signaltransduktionswegen, die Charakterisierung der Netzwerk-Topologie und die Identifizierung geschwindigkeitsbestimmender Schritte zu finden. Dieser systembiologische Ansatz erfordere zwingend eine bioinformatische Herangehensweise, da aufgrund der Komplexität keine intuitive Betrachtung mehr möglich sei. In der mathematischen Netzwerkmodellierung gäbe es zwei verschiedene Schulen: Zum einen die semi-empirische Modellierung kleiner, experimentell bereits gut parametrisierter Modelle (Beispiel der EGF-RAS Signaltransduktionsweg), die eine Modellierung der Flüsse und Raten durch Differentialgleichungen anstrebt. Zum anderen die ungenauere Modellierung großer Netzwerke mit Komponenten aus vielen Signaltransduktionswegen, die lediglich mit Wahrscheinlichkeiten (z. B. Monte Carlo Simulation) arbeitet. Als empirische Ausgangsdaten derartiger Modelle würden sowohl mRNA als auch Protein-Expressionsdaten Verwendung finden. Ein erstes Ergebnis derartiger Studien sei die Identifizierung von BRAF als wesentliche Kinase bei verschiedenen Krebsformen. Dabei habe insbesondere die Identifizierung der in Tumoren häufigen, konstitutiv aktiven Mutante BRAF-p.V600E (sog. Driver-Mutation) starke Beachtung gefunden. Die Entwicklung des mutationsspezifischen BRAF-Inhibitors Vemurafenib (RG7204 oder PLX4032), der nur die p.V600E-mutierte Form des BRAF Proteins inhibiert, nicht aber wildtyp-BRAF [1], stellt das vielbeachtete proof-of-principle dieses Ansatzes dar. Die Bedeutung protein- und sogar mutationsspezifischer

Inhibitoren der Signaltransduktion für die Krebstherapie unterstreicht die aktuelle Bedeutung dieses neuen Ansatzes.

Im zweiten Vortrag berichtete *Christine Sers* (ebenfalls vom Institut für Pathologie der Charité Berlin) über die **Integration neuer Technologien in die molekular-pathologische Diagnostik**. Ein wichtiges Beispiel sei auf dem Gebiet des kolorektalen Karzinoms (CRCA) die Transition von KRAS, das in ca. 40% der Tumoren mutiert sei, von einem diagnostischen zu einem therapeutischen Marker. Ein KRAS Wildtyp CRCA werde aktuell mit einer konventionellen Chemotherapie plus EGFi (Cetuximab oder Panitumumab)-Gabe behandelt. Ein CRCA mit aktivierender KRAS Mutation werde dagegen nur mit Chemotherapie ohne einen EGFi behandelt, da KRAS in der Signaltransduktion downstream von EGF ist, was infolge einer EGFi wirkungslos macht. KRAS und BRAF Mutationen kommen nur selten zeitgleich in einem CRCA vor, was ebenfalls nach spezifischen Therapieschemata verlangt. NRAS-Mutationen sind dagegen eher selten. Mittlerweile existieren mehrere Informationsquellen, die somatische Mutationen von Tumoren auflisten wie z. B. das cBioCancer Portal vom Sloan Kettering Memorial Institut, das derzeit 226 häufig auftretende genomische Veränderungen umfasst, dabei neben Veränderungen der Basensequenz auch transkriptionelle, Methylo-, miRNA, CNV und zytogenetische Varianten verzeichnet und regelmäßig aus den neuesten Studien upgedatet wird. Biotechnologische Firmen sind auf diesem Gebiet sehr aktiv, sodass Produkte entwickelt werden, die einzelne Signalwege in ihrer Gänze zugänglich machen (z. B. retrogrades RAS-Profilieren von Tumoren). Alle diese neuen diagnostischen Methoden taugen eher nicht zur Verdrängung etablierter Methoden, sondern ganz überwiegend zur Integration und Erweiterung bestehender diagnostischer und prädiktiver Schemata der molekular-pathologischen Diagnostik.

Im letzten Vortrag der Sitzung der Arbeitsgruppe Genomics berichtete *Frank Holtrup* (Inostics GmbH aus dem Hamburger Centrum für Innovative Medizin) über **komplexe molekulare Signaturen aus frei zirkulierenden Nukleinsäuren**. Nach der Apoptose bzw. auch der Nekrose neoplastischer Zellen sich typischerweise Nukleinsäurefragmente in einer Konzentration zwischen 1 und 50.000 Molekülen pro ml und einer typischen Länge zwischen 120 und 180 Basenpaaren (entsprechend einer nucleosomalen Windung der DNA) im Blut. Die Forschungen haben ergeben, dass die Größe des Tumors sowie die Apoptose- bzw. Nekrose rate mit der Menge der zirkulierenden Plasma-DNA korreliert, wobei aber manche Tumore in Bezug auf Nukleinsäurefreisetzung "dichter" sind als

andere. Erschwerend sei für deren Nachweis auch, dass sie oft nur $<0,01\%$ der gesamten frei im Plasma vorkommenden DNA (fDNA) ausmachen und der 99,99%-ige Hintergrund anderer Sequenzen eine hochdurchsatzfähige Sequenzieretechnologie, wie z. B. NGS erfordert. Im Zentrum des Vortrags stand der Nachweis dieser zirkulierenden tumorspezifischen DNA-Moleküle zu diagnostischen Zwecken. Als ein sehr vielversprechender Ansatz hat sich dabei die im Labor von Bert Vogelstein in Baltimore entwickelte BEAMing-Technologie erwiesen. Dabei ermöglicht die Next-Generation Sequencing Technologie (NGS) eine sog. digitale (d. h. klonale) PCR zur Amplifikation von äußerst gering konzentrierten Nukleinsäuremolekülen aus dem menschlichen Blut. Das Kernstück der Technik besteht in einer „Beadin Bubble Amplifikation“ an typischerweise ca. 10 Mio. Beads in ca. 100 μL Volumen. BEAMing inkorporiert auch die Safe Sequenzierungstechnologie mit barkodierten Primern, die beim Vorliegen identischer Sequenzen die Entscheidung erleichtern, ob diese als unabhängige Ergebnisse zu werten sind. Neben der Identifikation und Quantifizierung der tumorspezifischen Nukleinsäurefragmente sei auch die Bestimmung von Punktmutationen, kleinen InDels sowie Methylierungsmustern erfolgreich durchgeführt worden. Die Bestimmung tumorassoziierter CNVs und chromosomaler Translokationen sei im Prinzip machbar. Eine Auswertungsstrategie sei dabei das Filtern von im humanen Genom nicht vorkommenden Fusionsnukleinsäuren (z. B. aus Translokationen) sowie der Vergleich freier Plasma-DNA vs. lymphozytärer DNA desselben Patienten. Die Methode eignet sich besonders zum Rezidiv-Monitoring, insbesondere wenn ein mutantes Gen aus dem Tumor im Blut zirkuliert.

Arbeitsgruppe Biobanken

Die Sitzung der Arbeitsgruppe Biobanken stand unter dem Leitthema „Biobanking-Projekte in Deutschland“ und wurde von *Michael Kiehntopf* organisiert. In einer kurzen Einführung berichtete Herr Kiehntopf über die zunehmende Wichtigkeit von Biobanken im Rahmen einer modernen evidenzbasierten Medizin.

Im ersten Vortrag der Sitzung mit dem Thema „**Biobanken und Kohorten-Studien als Werkzeuge zur Identifizierung Molekularer Signaturen**“ berichtete *Annette Peters* vom Institut für Epidemiologie II am Helmholtz Zentrum München über die Bedeutung regionaler und nationaler Biobanken. Am Helmholtz Zentrum München seien in über 20 Jahren wichtige Erfahrungen

auf diesem Gebiet mit der in Augsburg durchgeführten KORA-Studie gesammelt worden. Nach einer initialen Fokussierung auf kardiovaskuläre Risikofaktoren im Rahmen des WHO-MONICA-Programmes (1976 und 2002) sei KORA mittlerweile eine umfassende prospektive bevölkerungsbezogene Studie zu breitgefächerten gesundheitsökonomischen Themen mit einer großen Datenbank einschließlich pharmakologischer Daten und einer Biomaterialiensammlung. Die Forschung mit Biomaterialien nehme mittlerweile bei KORA einen besonderen Schwerpunkt zur Identifizierung und Validierung neuer Biomarker ein. Weitere Schwerpunkte seien die Genotypisierung häufiger Genvarianten (genetische Epidemiologie, GWAS) sowie seltener Mutationen (mit NGS) und die prospektive Beobachtung der Probanden für erkrankungsbezogene Outcomes und klinische Endpunkte im Rahmen der regelmäßig durchgeführten Gesundheits-Follow-Ups. Darüber hinaus sei eine starke internationale Vernetzung und Harmonisierung der Daten und der projektbezogenen Datenauswertung aufgrund der oftmals notwendigen hohen Fallzahlen ein wesentlicher Schlüssel zum Erfolg derartiger Studien.

Im zweiten Vortrag referierte der Bayerische Landesdatenschutzbeauftragte *Thomas Petri* über **geplante Änderungen im EU-Datenschutzrecht und deren Bedeutung für die Forschung mit Biomaterialien**. Die in Deutschland einschlägigen Gesetze sind das BDSG (für öffentliche Stellen des Bundes und private Einrichtungen), das BayDSG (für öffentliche Stellen Bayerns und private Einrichtungen) sowie das BayKrG, das SGB V) und das StGB (§203), sowie das GenDG, wobei das letztere die Forschung ausdrücklich ausgeklammert. Die Rechtslage in Deutschland sei insoweit noch nicht harmonisiert, als es Sachverhalte gebe, die laut BDSG erlaubt aber durch das StGB ausgeschlossen seien. Hier bestehe weiterer Handlungsbedarf von Seiten des Gesetzgebers. Europaweit sei derzeit die EU-Datenschutzrichtlinie von 1995 das wesentliche rechtliche Instrument zu Daten und Biobanken. Es gebe mittlerweile erste erfolgreiche Ansätze zur Harmonisierung, wie zum ersten das Grundrecht, dass jede Datenverarbeitung einer Legitimation bedarf (durch ein Gesetz oder eine individuelle Einwilligung), zum zweiten, dass jede Einwilligung auf einen konkreten Zweck bezogen sein muss, welcher dann einer Rechtsgüterabwägung (Zweck vs. Sensibilität der Daten), z. B. durch eine Ethikkommission, unterzogen werden müsse. Zum dritten sei auch das Prinzip der Transparenz weitgehend akzeptiert, wonach jeder Betroffene Zugang zu dem Wissen erlangen müsse, wer seine Daten wo und zu welchen Zwecken verarbeite. Die Betroffenenrechte seien in Deutschland durch das Grundrecht auf

informationelle Selbstbestimmung darüber hinausgehend erweitert, dass den Betroffenen ein weitgehendes Recht auf Mitsteuerung seiner Daten eingeräumt werde. Dieses schließe die Auskunft, die Korrektur fehlerhafter Daten sowie das Löschen unter bestimmten Voraussetzungen ein. Verfassungsrechtlich sei ebenfalls geboten, dass ein Betroffener von den Betreibern einer Biobank über Rechtsänderungen informiert wird. Wichtige Verfahrensprinzipien zur technischen Umsetzung dieser Vorgaben seien der Datenschutz durch technische Vorrichtungen (z. B. durch Passwörter und Zugriffsrechtsbeschränkungen), eine eindeutige Trennung von Forschungsdatenbanken und Behandlungsdatenbanken und die Einrichtung behördlicher Datenschutzbeauftragter. Eine umfassende Anonymisierung sei wünschenswert, aber im Biobankbereich nicht immer umsetzbar, z. B. bei Studien, die ein Follow-up der Teilnehmer erfordern. Eine wichtige Quelle zu dem Thema sei der 22. Tätigkeitsbericht des Bayerischen Landesbeauftragten für den Datenschutz 2006, der sich ausführlich mit dem Thema befasste. Derzeit aktuelle Entwicklungen seien die Forderung des Deutschen Ethikrates nach einem Biobankengesetz, in dem u. a. ein Biobankengeheimnis eingeführt werden soll. Die beiden eingebrachten Gesetzesanträge dazu sind jedoch im Frühjahr 2013 in dem zuständigen Ausschuss ablehnend beschieden worden. Auf europäischer Ebene gebe es aktuell den Entwurf der EU-Datenschutz Grundverordnung (EU-GVO, 290 Seiten), die sich sehr an der deutschen Rechtslage orientiere und im Internet abrufbar ist.

Im dritten Vortrag mit dem Titel **„Biobanken-Management am Beispiel der IBDW: ethische, organisatorische und logistische Hürden“** berichtete *Roland Jahns*, Leiter der Interdisziplinären Biomaterial- und Datenbank Würzburg, über die Struktur und die Workflows der am Universitätsklinikum in Würzburg implementierten Daten- und Biobank IBDW. Vorläufer dieser Daten- und Biobank seien u. a. die Biobank zu Morbus Fabry des Deutschen Zentrums für Herzinsuffizienz (CHFC) und dermatologische und onkologische Banken am Standort Würzburg gewesen. Die aufgrund der Erfahrungen und fakultätsweiter Abstimmung für die IBDW gewählte Organisationsform bestehe aus einem Vorstand, einem Exekutivausschuss, der operativen Geschäftsführung, einem internen sowie einem externen wissenschaftlichen Beirat. Wichtige rechtliche und organisatorische Regeln seien dabei die Definition von Zugangsregeln für die Daten und Bioproben und eine Implementation, in der der Leiter der Biobank gegenüber anderen Beteiligten nicht weisungsgebunden ist. Entscheidend seien weiterhin einheitliche Regeln

(SOPs) für Labelling, Storage und ein LIMS mit integriertem QM-System. Die derzeit geschätzten Betriebskosten beliefen sich auf ca. 2 Mio. € pro Jahr. Die universitäre Ethikkommission habe der IBDW keine Einschränkung des Forschungsthemas auferlegt, weder in Bezug auf den Phänotyp noch auf den Genotyp oder andere Laborparameter, habe aber in zwei Jahren einen erneuten Diskussionstermin um die IBDW anberaunt. Ein Vorschlag der Kommission war die Limitierung der Einwilligung für fünf Jahre mit anschließendem Re-Consent. Wichtig sei aus Sicht der IBDW die aktuelle Diskussion zu einheitlichen Richtlinien zum Einwilligungsmanagement im Arbeitskreis der Bundes-Ethikkommissionen in Abstimmung mit Landes- und universitären Ethikkommissionen und Vertretern des Datenschutzes, die in 2013 verabschiedet werden. Wichtig sei dabei aus Sicht der IBDW u. a. eine rechtsgültige Regelung zum Umgang mit den Altproben mittlerweile Verstorbener. Ein wesentlicher Schritt zu Beginn der Implementierung der IBDW sei ein eindeutiges Festlegen des Workflows gewesen, die Möglichkeit der Gewinnung von Bioproben im Rahmen der Routinepatientenversorgung, differenzierte Workflows in feste und flüssige Proben und die fakultätsweite Abstimmung der Logistik auch bei dezentralen Standorten. Bei der IBDW stehen z. B. das Logistiksystem des Zentrallabors sowie ein Fahrdienst klinikumsweit zur Verfügung. Vorhanden seien mittlerweile zwei Großkühlager (-80°C , mit $<40\%$ Luftfeuchtigkeit und mit S2-Status), ein manuelles Lager (-140°C) und ein Gewebe-Schnellschnittlabor im OP-Trakt. Ein in Auftrag gegebenes Rechtsgutachten habe ergeben, dass die IBDW die Biobankaufklärung und Patienteneinwilligung nicht gleichzeitig mit dem Krankenhausaufnahmevertrag vornehmen dürfe und dass nur ein Arzt das Aufklärungsgespräch führen dürfe, was erst am Abend des Aufnahmetages gemacht werden würde, und beides zu einem erhöhten logistischen Aufwand im Patientenkontakt und damit zu höheren Kosten führe. Ein vierseitiger Informations- und Aufklärungsbogen werde dabei verwendet. Zusätzlich gebe es einen zweiseitigen Informationsflyer mit den Kernpunkten der IBDW, der im gesamten Klinikum ausliege. Bei jedem eingewilligten Patienten werde im Krankenhausinformationssystem (KIS) dann eine zuvor rote Ampel auf grün gesetzt, sodass für alle an der Routinepatientenversorgung Beteiligten sichtbar wäre, dass dieser Patient seine Zustimmung gegeben habe. Es gebe ein 3-faches Pseudonymisierungsschema verbunden mit der Reduktion der Daten in der Kerndatenbank, in der nur wenige Kerndaten gespeichert werden (Alter, Geschlecht, Ethnizität, ICD Hauptcode).

Arbeitsgruppe Bioinformatik

Der zweite Tag der Jahrestagung begann mit der Sitzung der Arbeitsgruppe Bioinformatik zum Thema Konstruktion multivariater Klassifikatoren in der Onkologie. In seiner Einführung zum Thema wies *Georg Hoffmann* (Trillium, Grafrath) auf ein fortbestehendes Dilemma der Früherkennung hin: die niedrige Prävalenz von Kranken im Kollektiv der offensichtlich Gesunden. Dies führe auch bei einem prädiktiven Test mit grundsätzlich guten Eigenschaften zu einer inakzeptabel hohen Anzahl falsch positiver Ergebnisse.

Im ersten Vortrag befasste sich *Frank Klawonn* (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) mit der Frage „**Wie viele Biomarker benötigt man für einen guten Klassifikator?**“. Als Biomarker bezeichnet man jede Messgröße, die den Gesundheits- oder Krankheitszustand einer Person charakterisiert (also zum Beispiel einen Laborwert, eine genetische Mutation, Kennzahlen des EKGs usw.). Ein Klassifikator ist jede Kennzahl, die der Unterscheidung von zwei oder mehr Patientenklassen (zum Beispiel gesund/krank) dient.

Klawonn verfolgte einen Bottom-Up-Ansatz, indem er schrittweise immer mehr Biomarker aufaddierte (sog. linearer Klassifikator, Score) und jeweils eine ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristic) durchführte. Als Maß für die Qualität dieser Klassifikatoren diente die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC = area under curve); eine AUC von 1,0 bedeutet 100%ige Trennung der Klassen, also keine falsch positiven oder falsch negativen Ergebnisse. Um nun die optimale Zahl von Biomarkern für einen „guten“ Klassifikator zu ermitteln, simulierte er normalverteilte, unabhängige Biomarker, von denen jeder nur eine AUC von 0,7 hatte. Mit zehn Biomarkern erhielt er eine AUC von 0,95 und mit 20 Biomarkern eine AUC von 0,99. In klinischen Studien werden heute meist sehr viel weniger Biomarker zu einem Klassifikator kombiniert. In einer realen Datensatz-Kombination von drei Biomarkern (AUC von 0,794, 0,707 und 0,636) ergab sich übereinstimmend mit dem vorgestellten mathematischen Modell eine AUC von nur 0,878 [2].

Klawonn untersuchte auch den Einfluss von Korrelationen zwischen den ausgewählten Biomarkern: Je stärker sie untereinander positiv korrelierten, desto weniger verbessert sich – erwartungsgemäß – die Aussagekraft der Kombination. Praktisch bedeutet dies, dass man nicht korrelierte oder negativ korrelierte Biomarker kombinieren sollte, um einen guten Klassifikator zu erhalten. In der Onkologie könnten das z.B. Expressionsdaten von Suppressor- und Promotorgenen sein.

Im zweiten Vortrag der Sitzung stellte *Michael Schröder* (Biotechnologie-Zentrum der TU Dresden) unter dem

Titel „**Google goes Cancer-innovativer Top-Down Ansatz**“ einen gegensätzlichen Ansatz vor: Er startete mit Massendaten aus Genexpressionsanalysen und reduzierte die Zahl der Biomarker schrittweise, um die optimale Anzahl für einen aussagekräftigen Klassifikator zu erhalten. Gesucht war ein Set von Genen, deren Expression zwischen Krebspatienten mit kurzen und langen Überlebenszeiten unterscheiden sollte.

Ein bekanntes Beispiel für dieses in der Bioinformatik gut etablierte Vorgehen ist der kommerzielle Mamma-print-Assay, der aus insgesamt 70 Genen den Outcome bei Brustkrebs vorhersagen soll. Zunächst hoch gefeiert, erwies sich diese Signatur bei kritischer Nachuntersuchung als wenig aussagekräftig und austauschbar: Ähnliche Ergebnisse konnte man auch mit 70 völlig anderen Genen erhalten.

Schröder wählte deshalb einen innovativen Top-Down-Ansatz namens NetRank, der vom PageRank-Algorithmus der Firma Google abgeleitet ist. Google identifiziert die informativsten Webseiten im Internet über die Anzahl der Verlinkungen, Schröders Ansatz orientierte sich stattdessen an biologisch relevanten Beziehungen von Genen untereinander. So wie eine Website, auf die viele andere verweisen, bei Google einen hohen PageRank erhält, sollten aus dem Meer möglicher Kandidatengene diejenigen einen hohen NetRank erhalten, die die Expression vieler anderer Gene beeinflussen – also beispielsweise Transkriptionsfaktoren. Ähnlich wie beim Bottom-Up-Ansatz des vorangegangenen Vortrags erwies sich für einen guten Klassifikator eine Anzahl von etwa zehn Biomarkern als optimal.

Konkret startete das Experiment mit Microarray-Daten von 30 Patienten, die wegen eines Pankreaskarzinoms operiert worden waren. Der NetRank-Algorithmus isolierte aus über 20.000 Genen sieben Transkriptionsfaktoren, deren Expression mit der Überlebenszeit korreliert (*STAT3*, *FOS*, *JUN*, *SP1*, *CDX2*, *CEBPA* und *BRCA1*). Ein Vergleich des Verfahrens mit anderen in der Literatur beschriebenen (t-Test, Pearson Korrelationstest, SAM etc.) ergab eine klare Überlegenheit des NetRank-Algorithmus.

Den dritten Vortrag in der Sitzung hielt *Alexander Leichtle* (Universitätsinstitut für Klinische Chemie am Inselspital Bern) zum Thema „**Added value durch Kombination von traditionellen mit neuen Tumormarkern**“. Bei der Auswahl der Biomarker zur Generierung klinisch nützlicher "Meta-Marker" mit optimierten Sensitivitäten und Spezifitäten komme häufig die Hauptkomponentenanalyse zum Einsatz, die sich aber als explorative Technik für praxistaugliche klinische Prädiktoren nicht gut eigne. Besser geeignet sei z.B. ein binominales logistisches Regressionsmodell: in einer Case-Control-Neoplasiestudie

mit drei Biomarkern (CEA, Glycin, Tyrosin) erzielte er eine AUC von 0,794. Damit war der kombinierte Klassifikator dem etablierten Tumormarker CEA allein klar überlegen.

Für Modelle mit drei Klassen kann man laut Leichtle anstelle der traditionellen AUC das VolumeundertheSurface (VUS) berechnen. Während bei der AUC ein Wert von 0,5 dem Zufall entspricht (Trefferwahrscheinlichkeit eines Münzwurfs), gilt für die VUS ein Grenzwert von 0,1667. Für einen neuen Klassifikator muss die geforderte Verbesserung hinsichtlich seiner diagnostischen Aussagekraft vorab klinisch festgelegt werden, für die AUC wird der Schwellenwert (δ) z.B. häufig bei 5% gesetzt.

Arbeitsgruppe Proteomics/ Metabolomics

Die Sitzung der Arbeitsgruppe Proteomics/Metabolomics zum Thema „Endokrinologische Profiling-Ansätze“ wurde von *Peter Findeisen* (Mannheim) eröffnet. Im ersten Vortrag beschäftigte sich *Rainer Lehmann* (Medizinische Klinik IV des Universitätsklinikum Tübingen) mit dem Thema „**Metabolomics in der Diabetesforschung – von der Studienplanung zum metabolischen Fingerabdruck**“. Das Ziel der Diabetes-Forschung ist nicht nur die Identifikation neuer Marker zur Klassifikation und Prädiktion des Krankheitsverlaufs, sondern auch ein tieferes pathobiochemisches Verständnis, mit der Hoffnung, neue, therapierelevante Targets zu entdecken. Insbesondere der Typ2 Diabetes mellitus (T2DM) ist aufgrund seiner dramatisch steigenden Prävalenz im Fokus. Es wurden Ergebnisse von gerichteten als auch ungerichteten Ansätzen zur Marker-Identifikation und Validierung gegenübergestellt. Bei Gesunden konnten nach oGTT durch non-targeted Metabolomics Palmitat, Gallensäuren und Lysophosphatidylcholin als regulierte Targets identifiziert und an prädiabetischen Patienten validiert werden; insbesondere gelang eine Differenzierung von Insulinresistenten und –sensitiven Patienten mit einer Signatur von 5 Metaboliten (beta-Hydroxybutyrat, Isoleucin, Lactat, Orotat, Pyridoxat). Auch das Risiko, einen T2DM zu entwickeln, lässt sich an einem metabolischen Profil aus 5 Aminosäuren ablesen (Framingham Offspring Study). Von großem Interesse sei auch die Identifikation von prädiabetischen Subtypen, welche progressiv in einer Insulinresistenz enden und nicht von Diät oder gesteigerter körperlicher Aktivität profitieren. Neben der Leberverfettung als starker Prädiktor wurde ein metabolisches Profil aus 7 Markern validiert [3]. Abschließend wurde auf die Bedeutung der Präanalytik für das hoch volatile Metabolom-Profil eingegangen

und die Messung von Hypoxanthin als Qualitätsmarker vorgestellt [4].

In einem weiteren Vortrag sprach *Manfred Rauh* (Klinisches Labor der Kinder- und Jugendklinik der Universität Erlangen) über „**Steroid-Profiling mittels Massenspektrometrie – Beispiele aus Klinik und Forschung**“. Er stellte in seinem praxisnahen Vortrag Beispiele des Steroid-Profiling mittels Massenspektrometrie aus Klinik und Forschung dar. Die Massenspektrometrie verdrängt aufgrund ihrer Leistungsfähigkeit dabei zunehmend die Immunoassays. Mittlerweile gibt es kommerzielle Steroid-kits für die MS-basierte Multiplex-Quantifizierung von bis zu 19 Analyten. Einsatzbereiche sind dann Erkrankungen wie die Congenitale Adrenale Hyperplasie (CAH) mit einem 21 α -Hydroxylase (CYP21A2) (90%) bzw. 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) (5%) Defekt der Steroid-Biosynthese. Die Enzymopathie führt dabei zu Substratstau (z.B. 17-OH Progesteron) bzw. Produktmangel (Cortisol) mit entsprechend charakteristischer Verschiebung im Steroidprofil. Metabolomische Alterationen konnten unter strikt natriumarmer Diät im Rahmen des Mars 500 Projektes („metabolischer Käfig“) analysiert werden [5]. Dabei fand sich ein rhythmisches Na(+) Exkretionsmuster, das unabhängig von Blutdruck und Salzaufnahme war. Die renale Exkretion von Aldosteron- und Cortisol weist dabei auf eine ebenfalls rhythmische, hormonale Kontrolle hin. Bei der Differenzierung von adrenocorticalen Tumoren und -Adenomen ist das endokrinologische Profiling der Mineralo- und Glukokortikoide aus Urinproben heute unentbehrlich [6]. Zunehmend besteht auch die Möglichkeit, Speichelproben für ein endokrinologisches Profiling einzusetzen.

Julia Dittrich (Universität Leipzig) berichtete über die Quantifizierung von Apolipoproteinen in humanen Seren mittels LC-QTrap Massenspektrometrie. Für die Untersuchungen wurden Proben der LIFE Heart Study verwendet, welche unter strikter präanalytischer Standardisierung gewonnen wurden. Nach tryptischem Verdau wurden proteotypische Peptide von insgesamt 7 Apolipoproteinen (Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo B-100, Apo C-I, Apo C-III, Apo E) mittels isotopengelabelter Standards absolut quantifiziert. Die verschiedenen Teilschritte des Protokolls wurden im Einzelnen optimiert. Dabei zeigten sich auffällige Unterschiede in der Kinetik des tryptischen Verdauens der je nach Protein nur einige Minuten aber auch bis zu 16 Stunden dauern kann; entsprechende Untersuchungen des Verdauerverhaltens sind daher bei jeder Methodenentwicklung notwendig. Das optimierte Protokoll zeigte schließlich eine Intra- und Inter-Assay-Variabilität von <13%. Die Korrelation der MS-Methode zu Immunoassays war ausreichend. Durch Optimierung der

Probenvorbereitung konnte die manuelle Arbeitszeit um 20% und die Kosten pro Analyse um 80% gesenkt werden, so dass wesentliche Voraussetzungen für die Anwendung der Methode in großen epidemiologischen/klinischen Studien gegeben sind.

Jan Budzies (Berlin), stellte Ergebnisse für das Hormonrezeptor-abhängige Metabolitenprofil des Mamma-Karzinoms vor. Die Entwicklung von optimierten Behandlungsstrategien ist wesentlich abhängig von der Klassifikation der Tumoren anhand von Biomarkern. Heute schon etablierte und therapieentscheidende Klassifikatoren des Mamma Ca sind etwa Her2neu, der Progesteron- und Östrogenrezeptorstatus oder der K67 Proliferationsindex. Hier soll das Metabolomic Profiling zusätzliche Informationen liefern. So konnten etwa mit GC-TOF MS Untersuchungen Veränderungen der membran-Phospholipid-Synthese charakterisiert werden. Mittels NMR-basiertem Metabolomic Profiling konnten weiterhin ductale und lobuläre Karzinome differenziert und molekulare Subtypen abgegrenzt werden [7]. Neueste Ergebnisse rücken eine Transferase in den Fokus des Interesses, welche im Tumorgewebe nicht nur hochreguliert ist, sondern sich auch medikamentös inhibieren lässt.

Das metabolomic Profiling kann daher zur Erhöhung der Trennschärfe der Tumor-Subklassifikation genutzt werden, um prognostisch und prädiktive Marker zu identifizieren. Schließlich führt die Metabolomanalyse komplementär zu anderen –Omics Daten (Genom- Proteom, Lipidom-) zu einem besseren pathophysiologischen Krankheitsverständnis, aus welchem sich auch neue Therapieoptionen ableiten lassen.

Zusammenfassend wurden auf der 12. Jahrestagung der Sektion Molekulare Diagnostik der DGKL eine Vielzahl zukunftsweisender Optionen der Modellierung und praktischen Anwendung molekularer Signaturen in Diagnostik und Therapie diskutiert. Die 13. Jahrestagung der Sektion ist für 15.-16. Mai 2014 wiederum in Tutzing geplant. Der aktuelle Arbeitstitel lautet „Genomanalysen im klinischen Alltag – rechtliche und ethische Aspekte“.

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

Eingang 31.7.2013; Akzeptanz 14.8.2013; vorab online veröffentlicht 16.10.2013

Literatur

1. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19.
2. Leichtle AB, Nuoffer JM, Ceglarek U, Kase J, Conrad T, Witzigmann H, et al. Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer. *Metabolomics* 2012;8:643–53.
3. Lehmann R, Franken H, Dammeier S, Rosenbaum L, Kantartzis K, Peter A, et al. Circulating lysophosphatidylcholines are markers of a metabolically benign nonalcoholic Fatty liver. *Diabetes Care* 2013;36:2331–8.
4. Yin P, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L, et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem* 2013;59: 833–45.
5. Rakova N, Juttner K, Dahlmann A, Schroder A, Linz P, Kopp C, et al. Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na(+) balance. *Cell Metab* 2013;17:125–31.
6. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libe R, Hughes BA, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3775–84.
7. Denkert C, Bucher E, Hilvo M, Salek R, Oresic M, Griffin J, et al. Metabolomics of human breast cancer: new approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome Med* 2012;4:37.