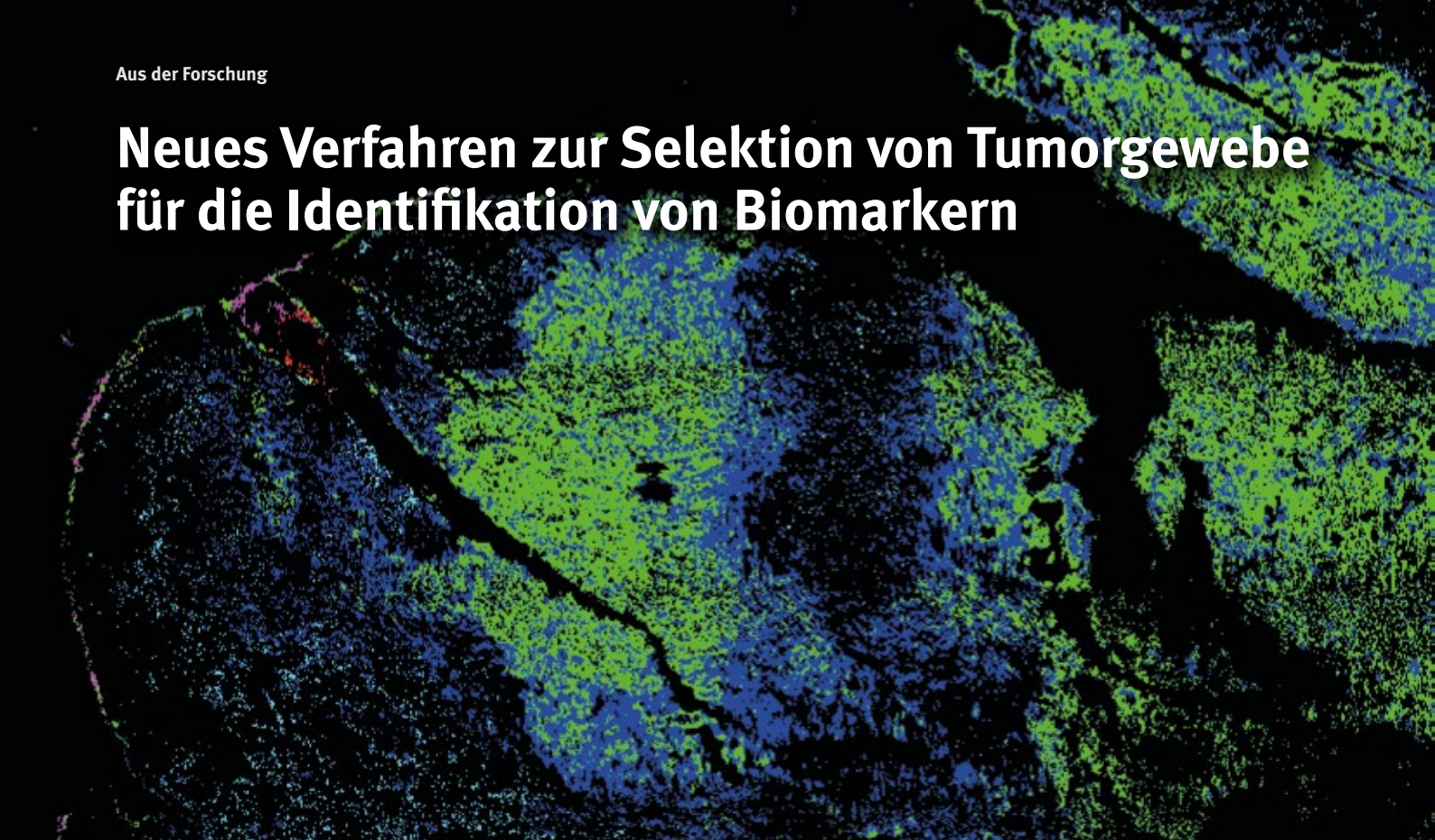


Neues Verfahren zur Selektion von Tumorgewebe für die Identifikation von Biomarkern



Label-freie Imaging Verfahren ermöglichen Charakterisierung und Gewinnung von Mesotheliom-Tumorgewebe als Basis für die Biomarkerentwicklung

Frederik Großerüschkamp, Klaus Gerwert

Dem Einsatz von Biomarkern zur Früherkennung von Krebserkrankungen in der nachgehenden Vorsorge kommt eine zunehmende Bedeutung zu. Dies gilt auch für die Früherkennung von asbestbedingten Mesotheliomen, für die zurzeit noch keine geeigneten Früherkennungsverfahren zur Verfügung stehen. Aufgrund der langen Latenz-Zeit zwischen der Asbesteinwirkung und der Entstehung eines Mesothelioms steigt auch heute, rund 25 Jahre nach dem Asbestverbot in Deutschland, die Zahl der als Berufskrankheit anerkannten Mesotheliome noch an. Im Rahmen eines Verbundprojektes des Europäischen Proteinforschungszentrums PURE konnte jetzt ein neuer Ansatz zur Identifikation von Proteinbiomarkern am Beispiel von Mesotheliomen etabliert werden. Dazu wurden so genannte markierungs-freie spektroskopische Verfahren zur Probengewinnung und -charakterisierung aus Gewebeschnitten entwickelt. Damit konnten sowohl gängige, bereits heute in der Pathologie mittels klassischer immunhistochemischer Färbung analysierte Biomarker, als auch neue Biomarker für Mesotheliome identifiziert werden.

Der Einsatz von Proteinbiomarkern im Bereich der nachgehenden Vorsorge stellt ein vielversprechendes Verfahren für die Früherkennung von Krebserkrankungen dar. Jedoch ist die Identifizierung von sensitiven und spezifischen Proteinbiomarkern weiterhin eine große Herausforderung [1]. Viele Studien sind bereits an der Heterogenität der untersuchten Gewebe gescheitert. Größere Probandenzahlen und gezieltes Training des analysierenden Personals können helfen, diese Probleme zu überwinden, jedoch bleibt vor dem Hintergrund der biologischen Varianz verschiedener Tumorgewebe die Schwierigkeit einer Identifikation geeigneter diagnostischer Proteinmarker bestehen. Durch das Europäische Proteinforschungszentrum PURE wurde jetzt am Lehrstuhl für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum, in Zusammenarbeit mit dem Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum, der Ruhrlandklinik in Essen und dem Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der DGUV (IPA), ein neues biospektroskopisches bildgebendes Verfahren zur Gewinnung von Gewebeproben an diffusen malignen Mesotheliomen der Pleura etabliert, welches

ohne die klassische Färbung von Gewebeschnitten mit Hämatoxylin-Eosin (HE) oder Antikörpern auskommt und somit markierungsfrei („Label-frei“) ohne chemische Beeinflussung des Probenmaterials durchgeführt werden kann [2].

Mesotheliome

Maligne Mesotheliome sind eine histologisch heterogene Krebsart, die drei Subtypen aufweist: epitheloid, sarkomatoid und biphasisch. Mesotheliome können sich im Bereich der Pleura, des Peritoneums, des Perikards und in sehr seltenen Fällen auch im Bereich der *Tunica vaginalis testis* entwickeln. Der wichtigste Kausalfaktor für die Entstehung von Mesotheliomen ist eine meist berufliche Exposition gegenüber Asbest. Die Entwicklung von Verfahren zur Früherkennung und Diagnostik von Mesotheliomen ist dahervon besonderem Interesse für die Unfallversicherungsträger. Den Goldstandard zur Diagnostik und Charakterisierung von Mesotheliomen stellt die pathologische-anatomische Befundung an Gewebedünnschnitten dar, die histologische und immunhistoche-

mische Färbungen einschließt [3]. Da Mesotheliome phänotypisch höchst heterogen sind, ist ihre räumlich aufgelöste molekulare Analyse schwierig. Eine weitere Schwierigkeit stellt darüber hinaus die differentialdiagnostische Abgrenzung zur Pleurakarzinose primär anderenorts lokalisierter Karzinome dar, insbesondere von Adenokarzinomen der Lunge [4]. Neben diesen Faktoren erschwert die niedrige Neuerkrankungsrate von Mesotheliomen die Durchführung von molekularen Studien an ausreichend großen Patientenkollektiven.

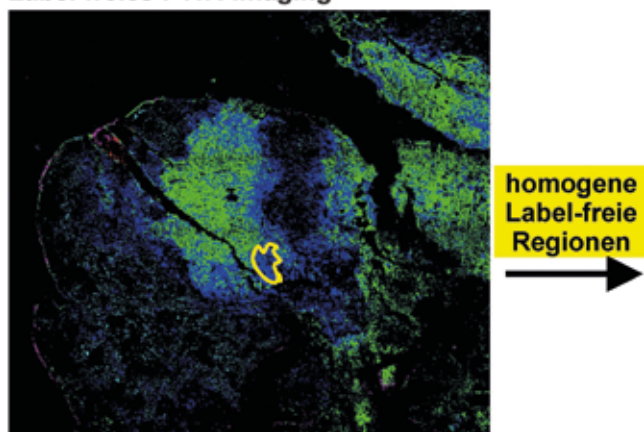
Neuartiger Ansatz für die Probenselektion

Der jetzt neu entwickelte Ansatz nutzt das Verfahren des sogenannten Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (kurz: FTIR)-Imaging, um einen unbekanntes Gewebedünnschnitt „Label-frei“ räumlich aufgelöst zu klassifizieren. Die so erhaltenen spektroskopischen Informationen zur Gewebeszusammensetzung können genutzt werden, um unterschiedliche Gewebe zu klassifizieren und im Anschluss besonders interessante Geweberegionen (u.a. erkranktes Gewebe) mit der Lasermikrodissektion (LMD) aus dem Dünnschnitt zu gewinnen. Bei der LMD handelt es sich um ein laserbasiertes Schneideverfahren, mit dem definierte Areale des Gewebes unter einem Mikroskop aus dem Gewebedünnschnitt geschnitten werden können. So war es möglich, entsprechend reines sarkomatoides und epitheloides Tumormaterial von Mesotheliomen zu sammeln und für eine vergleichende Proteomanalyse zur Verfügung zu stellen. Dabei konnten in den Proben mehrere aus pathologisch-anatomischen Untersuchungen bekannte Proteinbiomarker, wie beispielsweise das Protein Calretinin, bestätigt werden [2].

Glossar

- Als **Proteom** bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle oder Gewebe eines Lebewesens zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. Gesundheitszustand des Menschen)
- Als **Genom** wird die Gesamtheit der materiellen Träger der vererbaren Informationen (Erbgut) in einer Zelle oder Gewebe bezeichnet. Beim Menschen umfasst es die Chromosomen und die Erbsubstanz DNA.
- Das **Transkriptom** ist die Summe aller in einer Zelle oder Gewebe hergestellten RNA-Moleküle zu einem bestimmten Zeitpunkt, deren Funktion darin besteht, die genetische Information (das Genom) in entsprechende Proteine (das Proteom) umzusetzen.
- Als **Lipidom** bezeichnet man die Gesamtheit der Fette (Lipide) in einer Zelle beziehungsweise Gewebe und zu einem bestimmten Zeitpunkt. Lipide gehören neben Proteinen, Kohlenhydraten (Zuckern) und Nukleinsäuren (u.a. DNA) zu den vier Grundkomponenten einer Zelle.
- Das **Metabolom** umfasst alle Stoffwechsel-Eigenschaften einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt, unter anderem die Menge und Verteilung von Stoffwechselprodukten oder das Zusammenwirken unterschiedlicher Stoffwechselwege.

Label-freies FTIR-Imaging



Label-freie Proteomik

Protein	Antikörper
Calretinin	Calretinin
Zytokeratin 6	CK5/6
Zytokeratin 5	
Zytokeratin 19	CK mnf116
Zytokeratin 8	
NADH Dehydrogenase Untereinheit 8	möglicher Biomarker
Protein-glutamin gamma-Glutamyltransferase	möglicher Biomarker
Hypoxia hochreguliertes Protein 1	möglicher Biomarker
Kollagen alpha-1(VI) Kette	möglicher Biomarker

Abb. 1: Der Dünnschnitt wird Label-frei im infraroten Spektralbereich orts aufgelöst mit einem Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe eines bioinformatischen Klassifizierers berechnet man aus der Infrarotsignatur des Gewebes ein Indexfarbenbild (A, Label-freies FTIR-Imaging). Die grünen bzw. blauen Bereiche zeigen die Verteilung des sarkomatoiden bzw. des epitheloiden Subtyps des diffusen malignen Mesothelioms (DMM). Diese Daten werden an die Lasermikrodissektion (LMD) übergeben und ermöglichen das gezielte Ausschneiden jeweils homogenen Probenmaterials, z.B. des epitheloiden Subtyps. In der nachfolgenden Proteomanalyse werden dann die in diesem Gewebetyp enthaltenen Proteine (ca. 2.000) identifiziert und bioinformatisch ausgewertet. Vergleicht man die Proteinlisten der beiden Subtypen, können für den jeweiligen Subtyp jeweils charakteristische Proteine identifiziert werden, die als differentialdiagnostische Biomarker dienen können. Ein Beispiel für einen solchen Biomarker ist Calretinin. So tritt eine Färbung des Gewebes mit einem Antikörper gegen das für epitheloide Subtypen spezifische Calretinin auch in dem mittels der FTIR-LMD isolierten epitheloiden Tumorbereich auf. Neben bekannten Biomarkern konnten zudem zusätzlich auch neue Biomarkerkandidaten identifiziert werden.

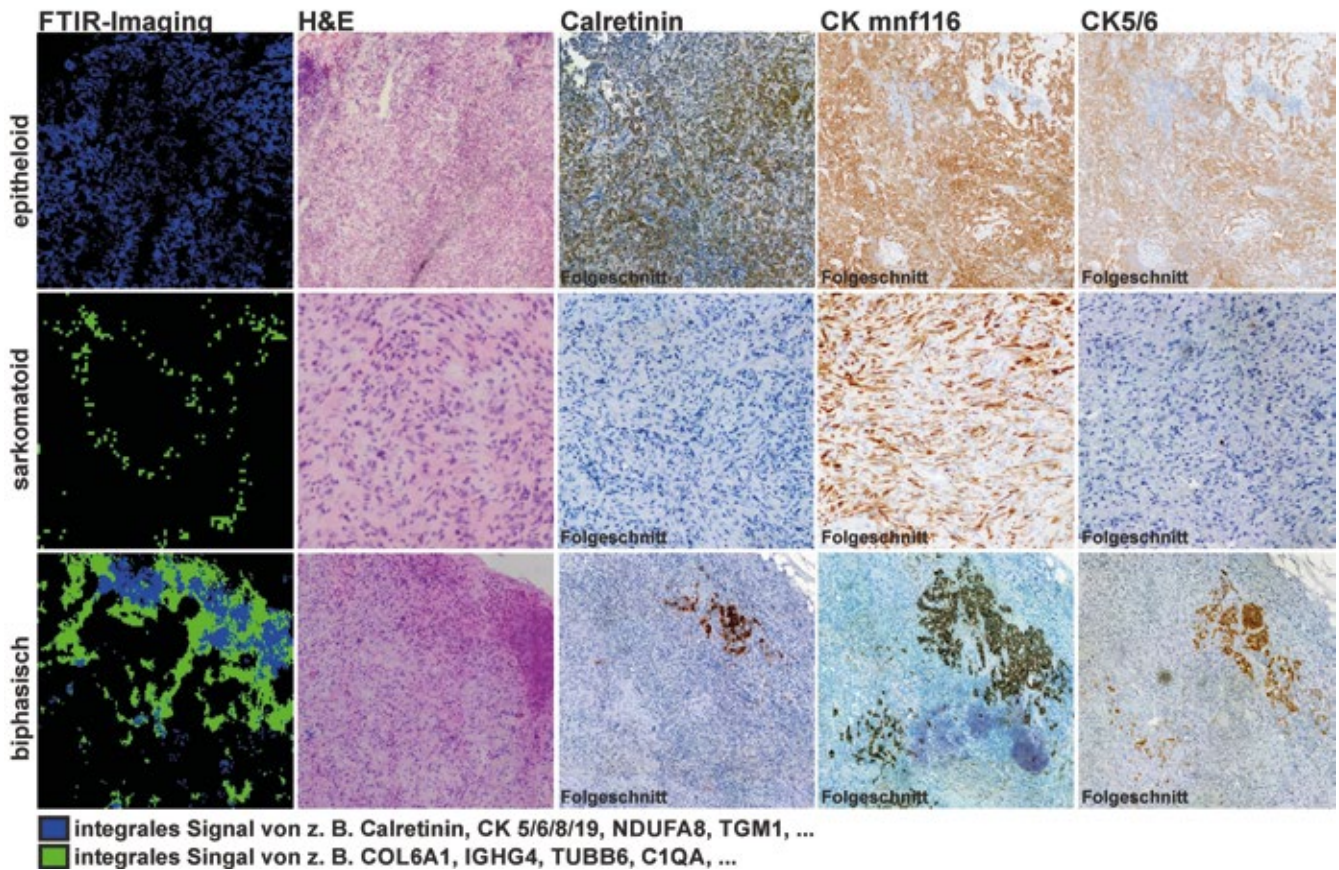


Abb. 2: Während der neue Ansatz Label-frei beide Subtypen direkt trennen kann und ein über sämtliche Proteine integriertes Signal („Klassifizierer“) liefert muss unter klassischer Herangehensweise in der Regel auf mehrere histologische und immunhistochemische Anfärbungen von einzelnen Proteinen, einem sogenannten Panel, zurück gegriffen werden, um die Subtypen differentialdiagnostisch zu trennen. Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur klassischen Herangehensweise lagen aktuell in unserer Analyse bei 100% und 75%.

FTIR-Imaging als Basis der Selektion und Charakterisierung

Die entscheidende Neuerung in diesem im Rahmen von PURE etablierten „Workflows“ ist der Einsatz des FTIR-Imagings als Label-freie Methode zur Klassifizierung von Gewebedünnschnitten. Dabei wird der Gewebedünnschnitt mit infrarotem Licht bestrahlt. Jedes Molekül absorbiert dabei die Strahlung, wobei das absorbierte Spektrum für jedes Molekül charakteristisch ist. Anhand seines Infrarotspektrums kann somit ein Molekül identifiziert werden: Wasser zum Beispiel hat zwei charakteristische Banden, eine Streckschwingungsbande und eine Biegeschwingungsbande; das Auftauchen dieser beiden Banden im Infrarotspektrum zeigt das Vorhandensein von Wasser direkt an. Ähnlich aber viel komplexer trägt im Gewebe eine Vielzahl von Molekülen zu einem Infrarotspektrum mit sehr vielen Banden bei, so dass ein für die gemessene Gewebeart charakteristisches Spektrum entsteht. Dabei werden im Gewebespektrum das Proteom, das Genom, das Transkriptom, das Lipidom und das Metabolom des Gewebes widergespiegelt (s. Glossar). Durch Vergleich der Spektren mit einer Datenbank kann so jedes Spektrum spezifisch einem Gewebe zugeordnet werden. Dies ist vergleichbar mit dem Fingerabdruck zur Identifizierung von Personen. Dieser Vorgang ist Label-frei und die Gewebeprobe wird dabei nicht chemisch verändert wie dies zum Beispiel bei der klassischen Anfärbung von Gewebestrukturen oder mittels Antikörpern der Fall ist. In 2015 konnte von der Arbeitsgruppe um Klaus Gerwert bereits das Potential des FTIR-Imagings zur Charakterisierung von thorakalen Tumoren mit einer Sensitivität von 91 Prozent und einer

Spezifität von 97 Prozent im Vergleich zur histologischen Annotation gezeigt werden. Ähnlich erfolgreich war das Verfahren auch bei der Differentialdiagnose der Subtypen des Adenokarzinoms der Lunge mit einer Genauigkeit von 96 Prozent [5]. Um die sehr präzise Label-freie räumlich aufgelöste Gewebeklassifizierung durch FTIR-Imaging mit der Gewinnung tumorreiner Probenmaterialien zu verknüpfen, wurde die Methode der FTIR-gekoppelten Lasermikrodissektion entwickelt.

FTIR-gekoppelte Lasermikrodissektion (LMD)

Um möglichst reine Gewebereiche (z.B. Tumoreareale) aus Dünnschnitten für weiterführende Untersuchungen zu gewinnen, wird die gewonnene räumlich aufgelöste Gewebeklassifizierung auf eine LMD übertragen. Mit letzterer ist es möglich unter mikroskopischer Auflösung ausreichend reine Tumoreareale aber auch benachbarte gesunde Gewebereale aus dem Gewebe zu schneiden und diese für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Klassisch wird dies an Folgeschnitten von gefärbten Dünnschnitten durchgeführt. Da die Tumorverteilung zwischen einzelnen Folgeschnitten jedoch variiert, erhält man mit der Dissektion des Folgeschnitts nicht unbedingt eine homogene Probe des Tumors. Auch kann der gefärbte Schnitt nicht selbst zur Gewinnung Label-freier Tumormaterialien herangezogen werden, auch da die durchgeführte Färbung häufig mit den Folgeanalysen nicht kompatibel wäre. Die in dem neu entwickelten Verfahren durchgeführte Label-freie Gewebeklassifizierung erlaubt hingegen die Nutzung desselben Gewebeschnitts

zur Gewinnung von reinem Tumormaterial. Hierzu wird das Gewebe mit FTIR-Imaging anhand der gewebspezifischen Spektren charakterisiert und klassifiziert (Abb. 1A). Anschließend werden die Informationen von ausgewählten Regionen von Interesse (ROI) an eine LMD übertragen und diese aus demselben nativen Gewebedünnschnitt herausgeschnitten. Diese nativen homogenen Proben stehen dann für molekulare Analyseverfahren aus dem Bereich der Proteomik oder Genomik zur Verfügung (Abb. 1A). Der Ansatz erlaubt es, Gewebe (u.a. Tumorgewebe) sehr präzise mit einer hohen Sensitivität und Spezifität zu klassifizieren und für -omik-Studien zugänglich zu machen, wie unter anderem in der aktuellen Studie anhand der Subtypen des diffusen malignen Mesothelioms (DMM) gezeigt werden konnte.

Mesotheliom-Subtypen in der Proteomik

Unter Einsatz der FTIR-gekoppelten LMD wurden epitheloide (n=5) und sarkomatoide (n=4) Gewebereiche aus Proben von neun Patienten gesammelt. Die Proben wurden anschließend dem medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum zur Proteomanalyse zur Verfügung gestellt. Positive Marker, die sich in internationalen Leitlinien bewährt haben (u.a. Calretinin, Zytokeratin 5/6) und derzeit in der Pathologie zur immunhistochemischen Färbung von Mesotheliomen eingesetzt werden, konnten auch mit hoher statistischer Signifikanz in der Proteomanalyse wiedergefunden werden. Die mit dem Label-freien FTIR-LMD gewonnenen Proben liefern also in der Proteomik analoge Ergebnisse wie die klassischen immunhistochemischen Marker und bestätigen damit indirekt das Probengewinnungs- und charakterisierungsverfahren mittels FTIR-LMD (Abb. 1B). Neben der Bestätigung bereits bekannter Proteinmarker für das Mesotheliom ermöglicht die Label-freie Gewinnung von reinem Tumormaterial aber auch die Identifizierung neuer Biomarker. Insgesamt konnten 142 Proteine identifiziert werden, die unterschiedlich häufig im Gewebe der beiden Subtypen auftreten.

Fazit

Durch die Verifizierung des jetzt etablierten Workflows anhand bereits bekannter Biomarker für Mesotheliome konnte das große Potential der Label-freien FTIR-gekoppelten LMD bei der Probengewinnung von Tumormaterial und für die sich anschließende Biomarkersuche gezeigt werden. Dabei ist herauszustellen, dass der automatisierte Charakter des Ansatzes die Nutzervariabilität in der Probenselektion minimiert und damit die Qualitätssicherung erhöht. Weiterhin wird die Auswahl homogenerer Proben für die Biomarkersuche möglich. Eine Übertragung auf weitere -omik-Techniken ist ohne weiteres möglich und soll in weiteren Studien erfolgen. Insbesondere ist eine Kopplung mit NGS (Next Generation Sequencing) geplant, die neben der Identifizierung von Proteinbiomarkern auch die Identifizierung neuer genomischer Marker zur Früherkennung von Krebserkrankungen erlaubt.

Die Autoren:
Prof. Dr. Klaus Gerwert,
Dr. Frederik Großerüschkamp
 Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum

Beteiligte Zentren

Die Studie zur „Entwicklung proteomanalytischer Verfahren zur Identifikation von Kandidatenmarkern zur Unterstützung der (Früh-)Diagnose asbestassoziierter Lungen- und Pleuratumoren“ (FP-339) wurde im Rahmen des PURE Konsortiums („Protein research Unit Ruhr within Europe“) der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. In der hier vorgestellten Arbeit kooperieren mit dem Lehrstuhl für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum das IPA (Prof. Dr. Brüning und Prof. Dr. Behrens), die Ruhrlandklinik in Essen (Dr. M. Altmayer, MPH und Prof. Dr. G. Stamatis - Emeritus, Leitung Thoraxchirurgie und thorakale Endoskopie -, Prof. Dr. K. W. Schmid und Prof. Dr. D. Theegarten - Leitung Institut für Pathologie) und das medizinische Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum (Prof. Dr. Barbara Sitek) für die Proteomanalysen. Weiterhin waren an der Studie an der Ruhrlandklinik in Essen Prof. Dr. L. Freitag und PD Dr. K. Darwiche, MPH, (Leitung Interventionelle Pneumologie/Bronchologie) beteiligt.

Literatur

1. Espina V, Mueller C, Edmiston K, Sciro M, Petricoin EF, Liotta LA. Tissue is alive: New technologies are needed to address the problems of protein biomarker pre-analytical variability. *Proteomics. Clinical Applications* 2009; 3: 874 – 882
2. Großerüschkamp F, Bracht T, Diehl HC, Kuepper C, Ahrens M, Kallenbach-Thieltges A, Mosig A, Eisenacher M, Marcus K, Behrens T, Brüning T, Theegarten D, Sitek B, Gerwert K. Spatial and molecular resolution of diffuse malignant mesothelioma heterogeneity by integrating label-free FTIR imaging, laser capture microdissection and proteomics. *Scientific Reports* 2017; 7: 44829
3. Kim O, Krausz T. Differentiating Sarcomas from Mesotheliomas. In: Pass HI, Vogelzang N, Carbone M, Hrsg. *Malignant mesothelioma. Advances in pathogenesis, diagnosis, and translational therapies.* New York: Springer; 2005: 527 – 542
4. Lucas D R, Pass, H I, Madan S K, Adsay N V, Wali A, Tabaczka P, Lonardo F. Sarcomatoid mesothelioma and its histological mimics: a comparative immunohistochemical study. *Histopathologie* 2003, 42: 270-279
5. Großerüschkamp F, Kallenbach-Thieltges A, Behrens T, Brüning T, Altmayer M, Stamatis G, Theegarten D, Gerwert K. Marker-free automated histopathological annotation of lung tumour subtypes by FTIR imaging. *Analyst* 2015; 140: 2114 – 2120