

Molekulare Marker in der Pädiatrischen Onkologie

Frank Westermann M. D.

Department of Tumor Genetics, B030

German Cancer Research Center

Heidelberg, Germany

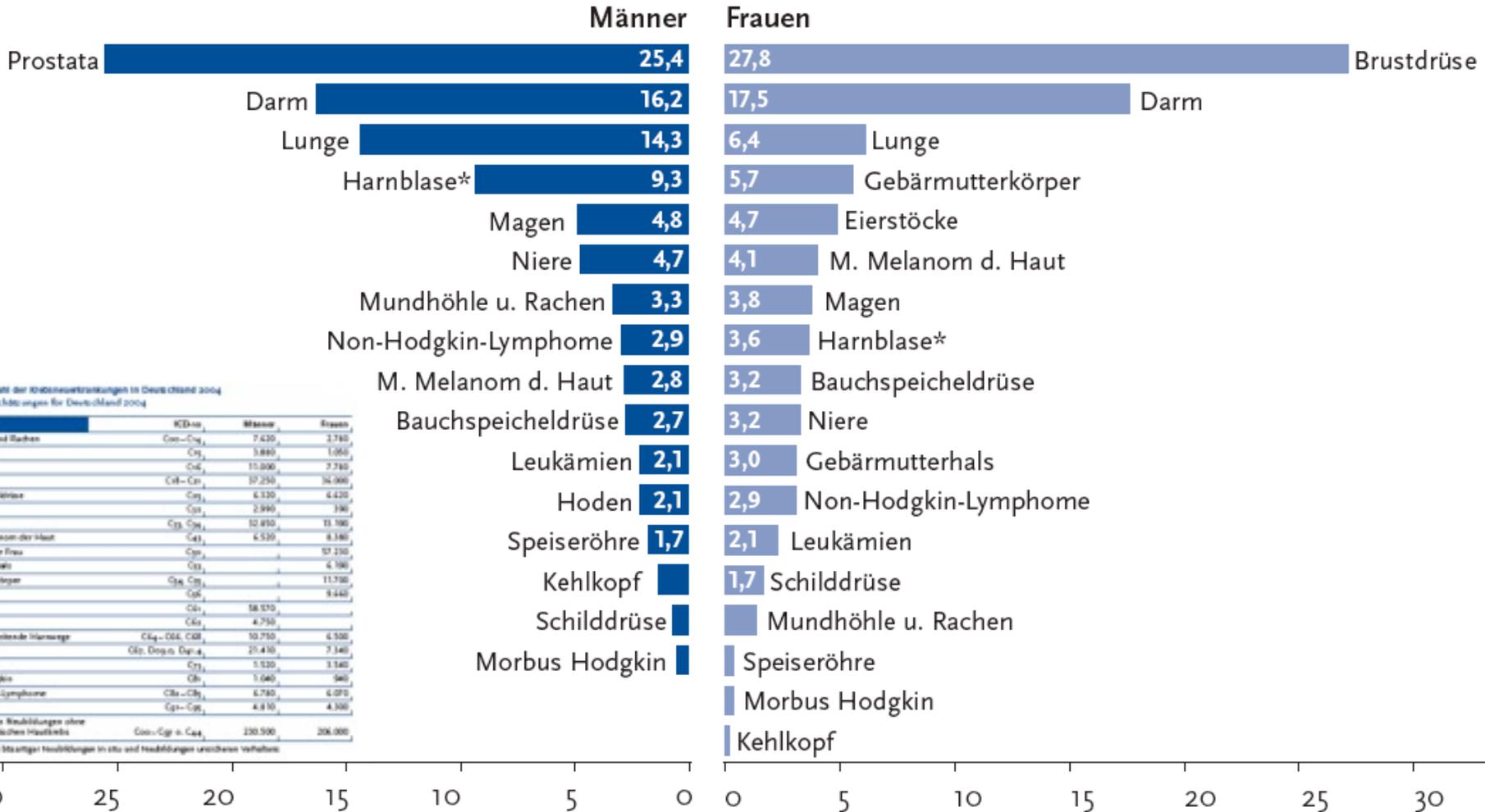


GERMAN
CANCER RESEARCH CENTER
IN THE HELMHOLTZ ASSOCIATION

Kreberkrankungen bei Erwachsenen in Deutschland

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004

Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut



Geschätzte Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2004
Quelle: RKI-Schätzungen für Deutschland 2004

Lokalisation	ICD-10	Männer	Frauen
Mundhöhle und Rachen	C00-C04	7.620	2.780
Speiseröhre	C15	3.880	1.050
Magen	C16	10.800	7.780
Darm	C18-C20	17.250	16.000
Bauchspeicheldrüse	C25	6.120	4.420
Kehlkopf	C32	2.940	1.90
Lunge	C33-C34	10.450	11.500
Maligne Melanome der Haut	C43	4.520	8.380
Blutbildendes Gewebe	C81	12.210	12.210
Gebärmutterhals	C53	-	4.100
Gebärmutterkörper	C54-C55	-	11.520
Eierstöcke	C56	-	9.440
Prostata	C61	18.570	-
Hoden	C62	4.750	-
Niere und ableitende Harnwege	C64-C66, C68	10.750	4.520
Harnblase*	C69, D09.0, D09.4	10.430	7.140
Schilddrüse	C73	5.520	3.540
Morbus Hodgkin	C81	1.040	940
Non-Hodgkin-Lymphome	C82-C85	6.780	4.070
Leukämien	C91-C95	4.830	4.300
Alle in situartige Neubildungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs	C00-C04 u. C44	130.500	206.000

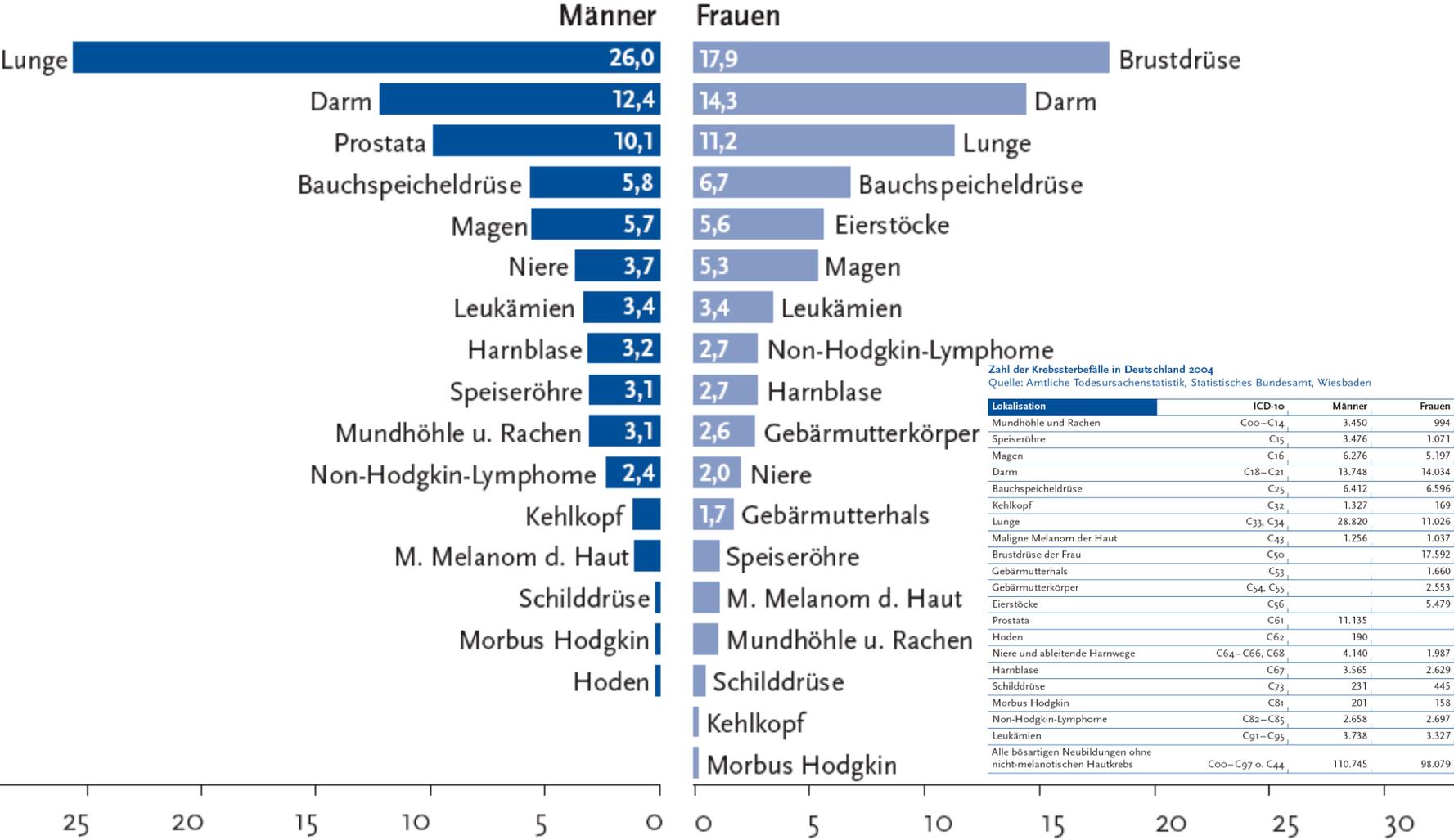
* einschließlich in situ-Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens

* einschließlich bösartiger Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens

Krebssterbefälle bei Erwachsenen in Deutschland

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2004

Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden



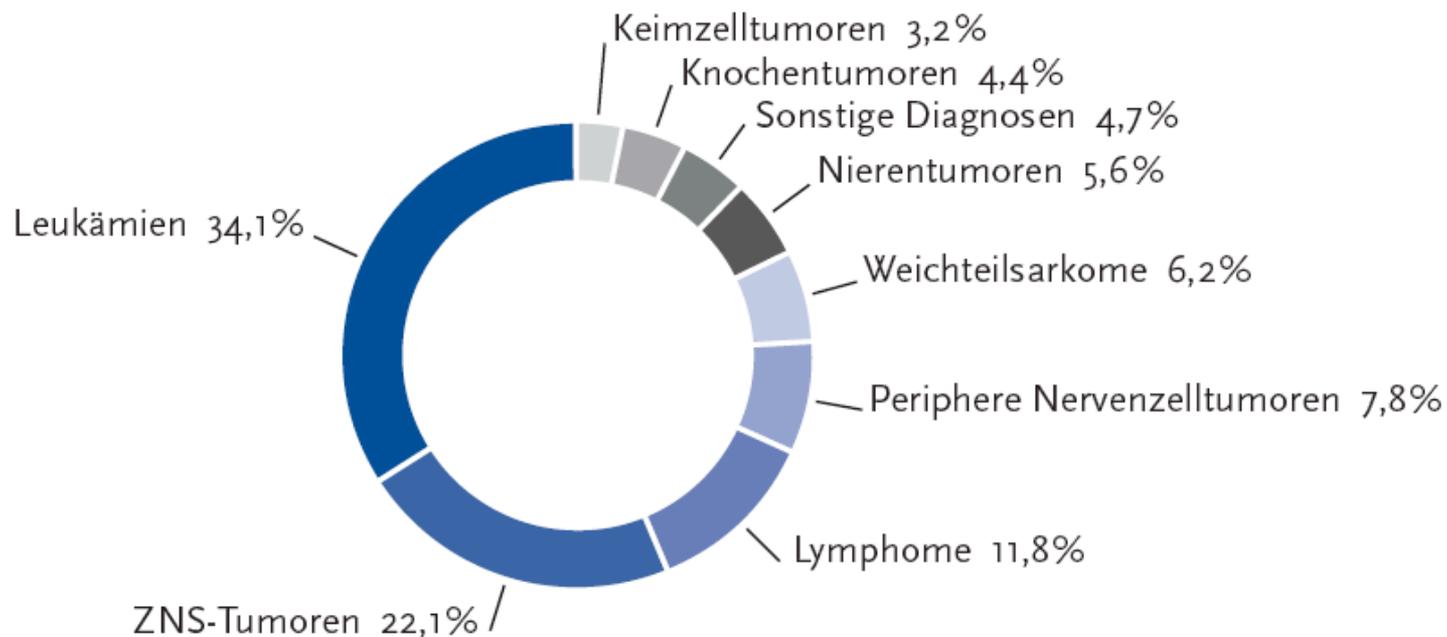
Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland 2004
Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

Lokalisation	ICD-10	Männer	Frauen
Mundhöhle und Rachen	C00-C14	3.450	994
Speiseröhre	C15	3.476	1.071
Magen	C16	6.276	5.197
Darm	C18-C21	13.748	14.034
Bauchspeicheldrüse	C25	6.412	6.596
Kehlkopf	C32	1.327	169
Lunge	C33, C34	28.820	11.026
Maligne Melanom der Haut	C43	1.256	1.037
Brustdrüse der Frau	C50		17.592
Gebärmutterhals	C53		1.660
Gebärmutterkörper	C54, C55		2.553
Eierstöcke	C56		5.479
Prostata	C61	11.135	
Hoden	C62	190	
Niere und ableitende Harnwege	C64-C66, C68	4.140	1.987
Harnblase	C67	3.565	2.629
Schilddrüse	C73	231	445
Morbus Hodgkin	C81	201	158
Non-Hodgkin-Lymphome	C82-C85	2.658	2.697
Leukämien	C91-C95	3.738	3.327
Alle bösartigen Neubildungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs	C00-C97 o. C44	110.745	98.079

Krebserkrankungen bei Kindern in Deutschland

Quelle: Deutsches Kinderkrebsregister (DKKR)

Krebs bei Kindern (ermittelt aus den Jahren 1997–2006)



⇒ **1.800 Krebserkrankungen bei Kindern im Jahr**

⇒ **Bei jedem 500. Kind wird bis zum 15. Lebensjahr eine bösartige Krebserkrankung diagnostiziert**

Krebserkrankungen bei Kindern

Inzidenz und Überlebensraten in Prozent, ermittelt aus den Jahren 1997–2006

Krebserkrankungen	Inzidenz*	Überlebensraten in Prozent		
		nach 3 Jahren	nach 5 Jahren	nach 10 Jahren
Hodgkin Lymphome	0,7	97	97	95
Keimzelltumoren	0,5	95	94	92
Lymphatische Leukämien	4,1	91	88	85
Nephroblastome	0,9	91	90	89
Non-Hodgkin-Lymphome	0,8	88	87	86
Neuroblastome u. Ganglioneuroblastome	1,3	83	78	75
Osteosarkome	0,3	82	73	68
Astrozytome	1,5	79	77	73
Rhabdomyosarkome	0,5	78	74	71
Ewingtumoren u. verwandte Knochensarkome	0,3	74	69	65
Intrakranielle u. intraspinale embryonale Tumoren	0,8	68	61	52
Akute myeloische Leukämien	0,7	65	62	60
Alle Malignome	15,0	84	81	77

* bezogen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren, altersstandardisiert auf die westdeutsche Bevölkerung 1987

⇒ Überlebensrate (insgesamt) 81% (nach 5 J.), 77% (10 J.), 76% (15 J.)

- **Diagnose**
 - Früherkennung möglich?
 - Welcher Tumortype? Welches Ursprungsgewebe?
 - Ausdehnung der Tumoren (Staging)
 - primär lokale Ausdehnung
 - Metastasierung
 - Einschätzen der Prognose mit klinischen und molekularen Markern
 - Risikostratifizierung (individualisierte Therapie)
- **Therapie**
 - Chirurgie
 - Chemotherapie
 - Bestrahlung
 - Knochenmark-Transplantation
 - Biologie-basierte Therapien (ursächlich)

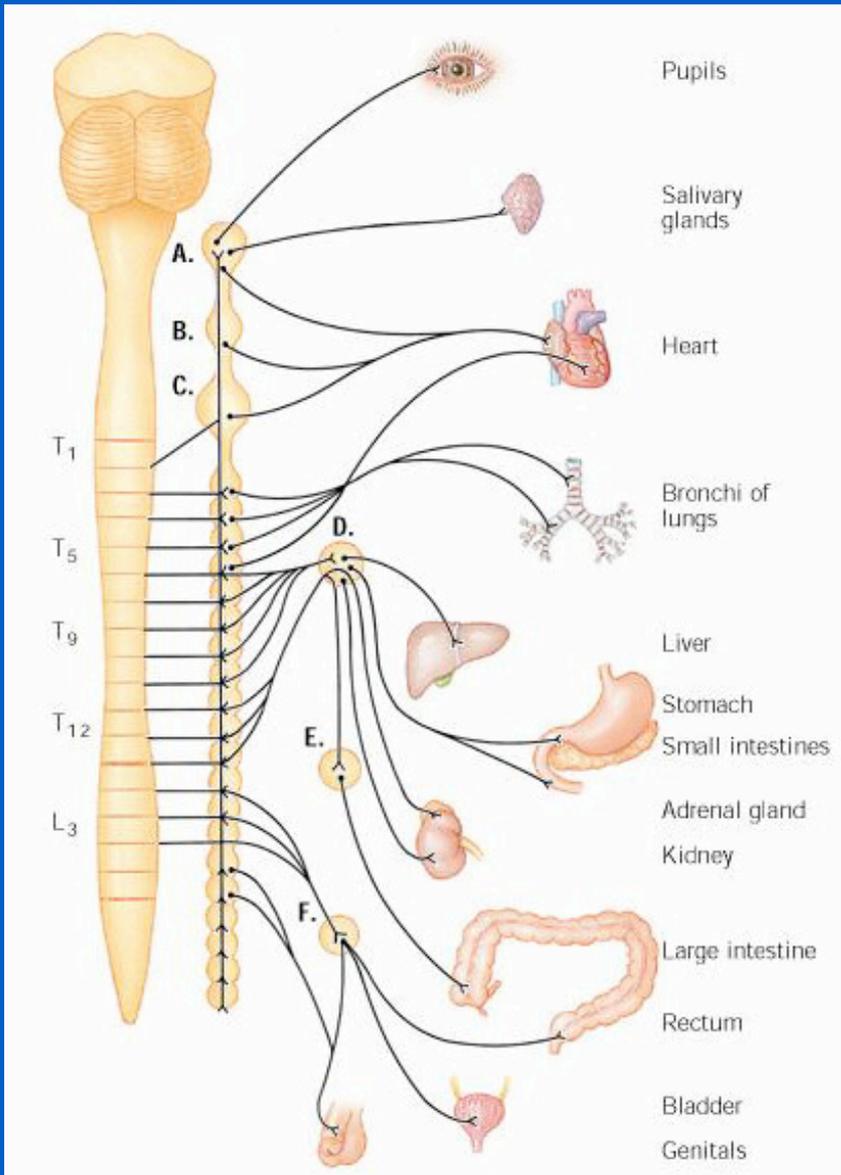
- **Besseres Verständnis der Tumorbiologie und Pathogenese**
- **Molekulare Marker zur Klassifizierung für eine verbesserte Diagnose bzw. Vorhersage der Prognose (Prädiktion, Risiko-Stratifizierung)**
- **Neue therapeutische Ansätze**

DIAGNOSE + THERAPIE

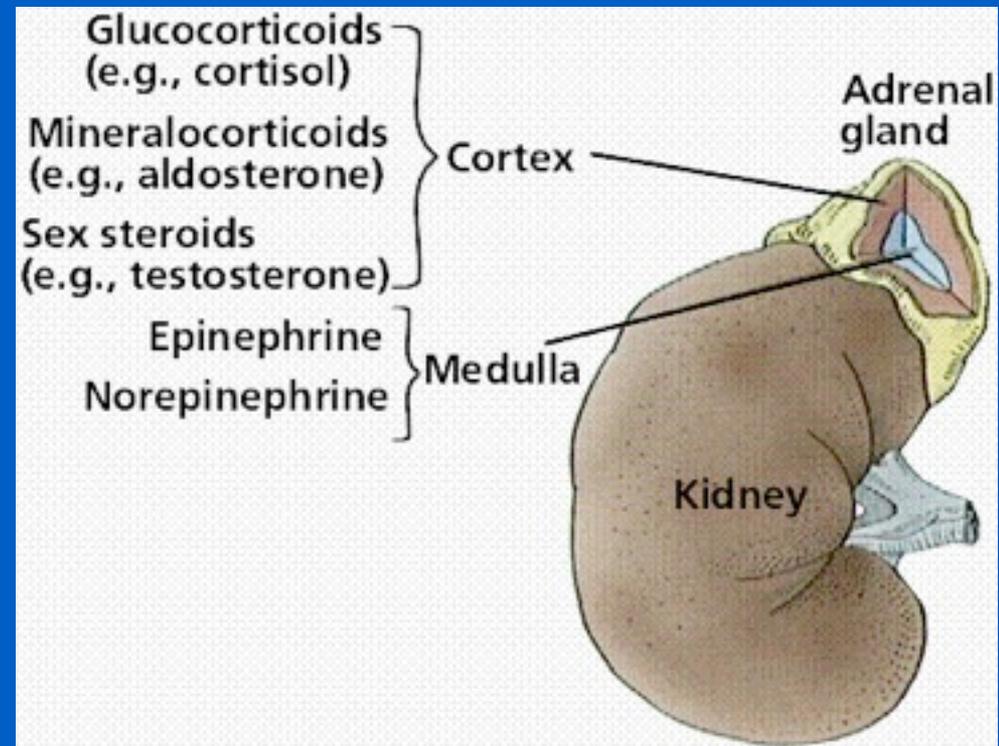
Bsp.: das Neuroblastom

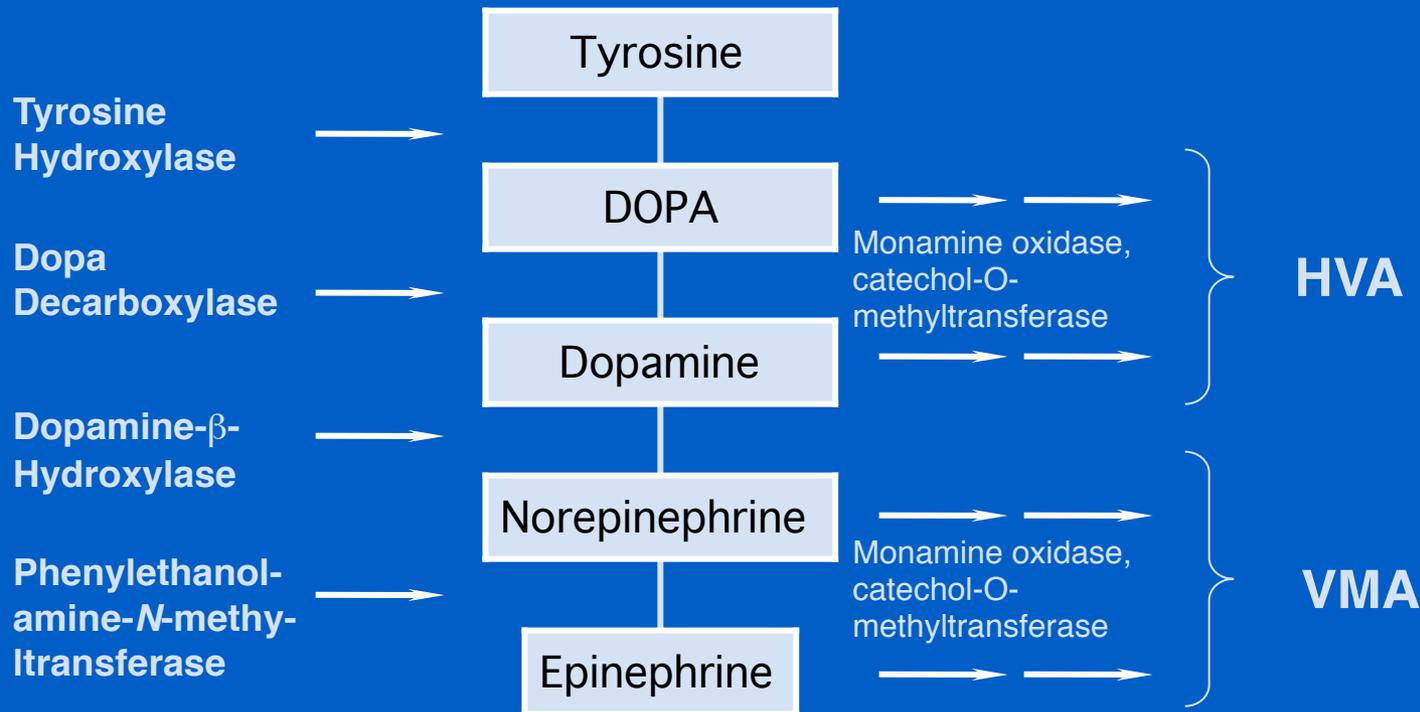
- **Häufigste solide Tumor im Kindesalter (140 Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr)**
- **Ursprungsgewebe sind primitive Zellen des Sympathischen Nervensystems**
- **Klinische und biologische Heterogenität**
 - **Stadium 1-3 (lokalisiert), 4 (disseminiert), 4s (spezial)**
 - **5-Jahres Überlebensrate: 64%**
- **Einzigartige Charakteristika (i. e. Spontane Regression)**
- **Modell für embryonale Tumoren (Nephroblastom, Medulloblastom, Hepatoblastom, Retinoblastom) und “small round blue-cell” Tumoren (i.e. Melanom, Subtyp der Lungenkrebse)**

Das Periphere Sympathische Nervensystem (SNS)



- Die Lokalisation von primären NBs sind auf das SNS beschränkt

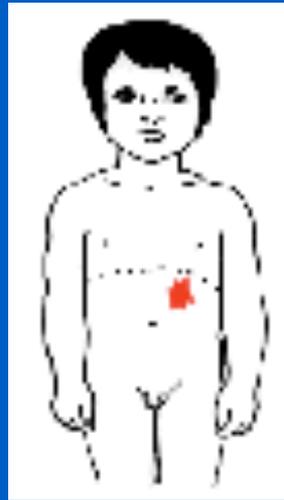




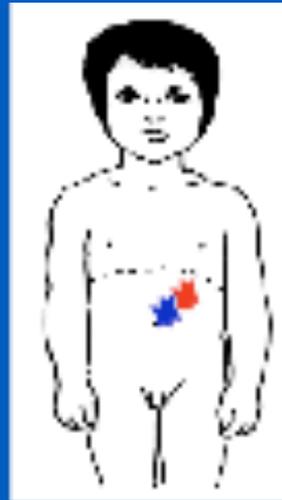
90-95% der NBs produzieren Katecholamine, dessen Metabolite im Urin nachweisbar sind (Diagnose, Aktivität der Erkrankung kann verfolgt werden)

Klinisches Staging der Neuroblastome (INSS)

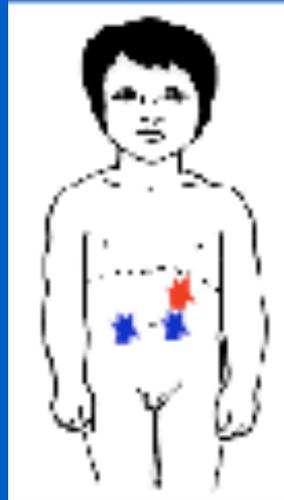
Stage 1:
Tumor limited to organ
or structure of origin



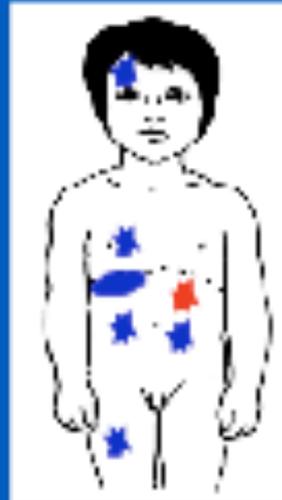
Stage 2:
Tumor spreads locally



Stage 3:
Tumor crosses midline



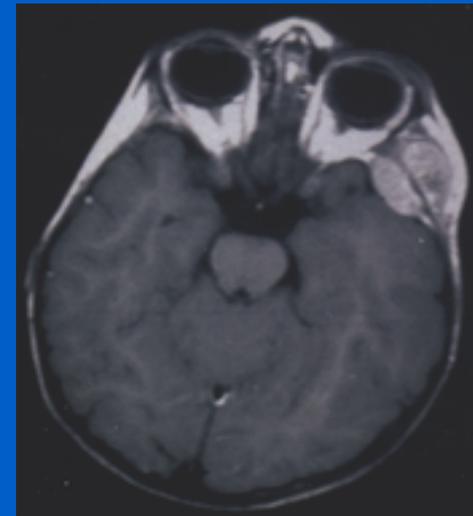
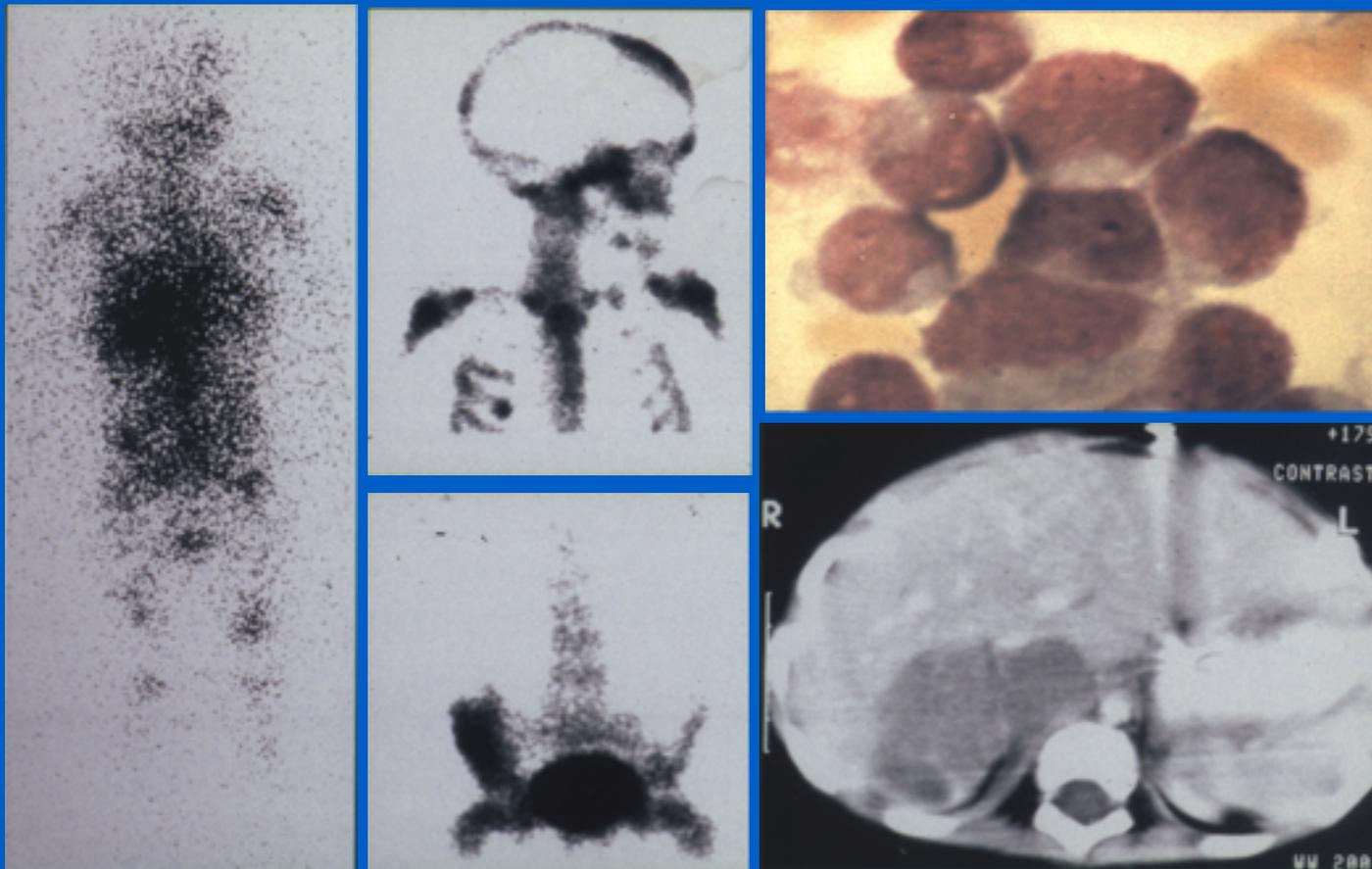
Stage 4:
Tumor metastasizes
to different sites



Neuroblastom Stadium 4

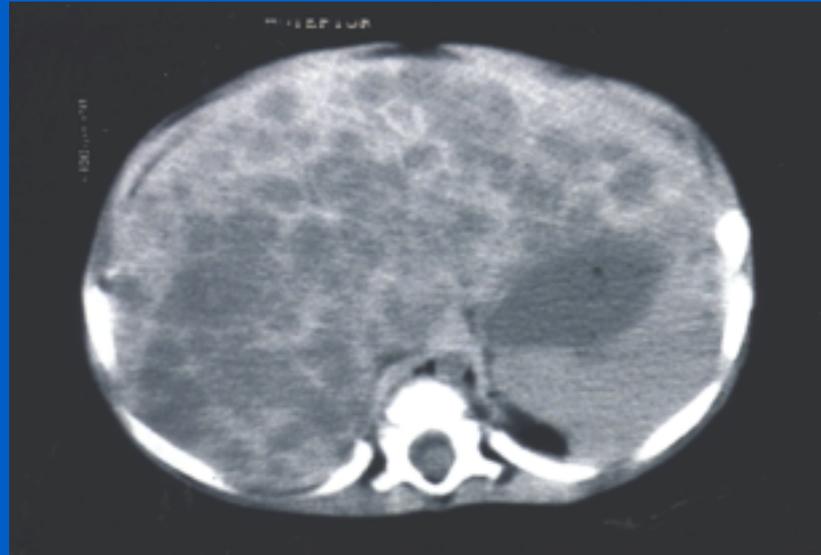
Diagnose 2/92: Chemotherapie, Chirurgie, Radiotherapie

Rezidive 10/92



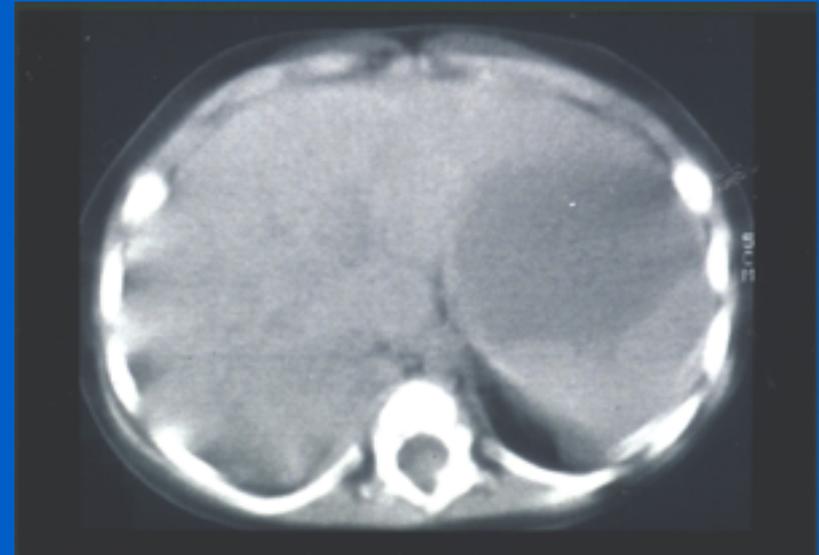
Neuroblastom Stadium 4s (spezial) (Klinisches Syndrom)

Diagnose 1/95



Lebermetastasen

Kontrolle 8/95 nach Chirurgie 4/95



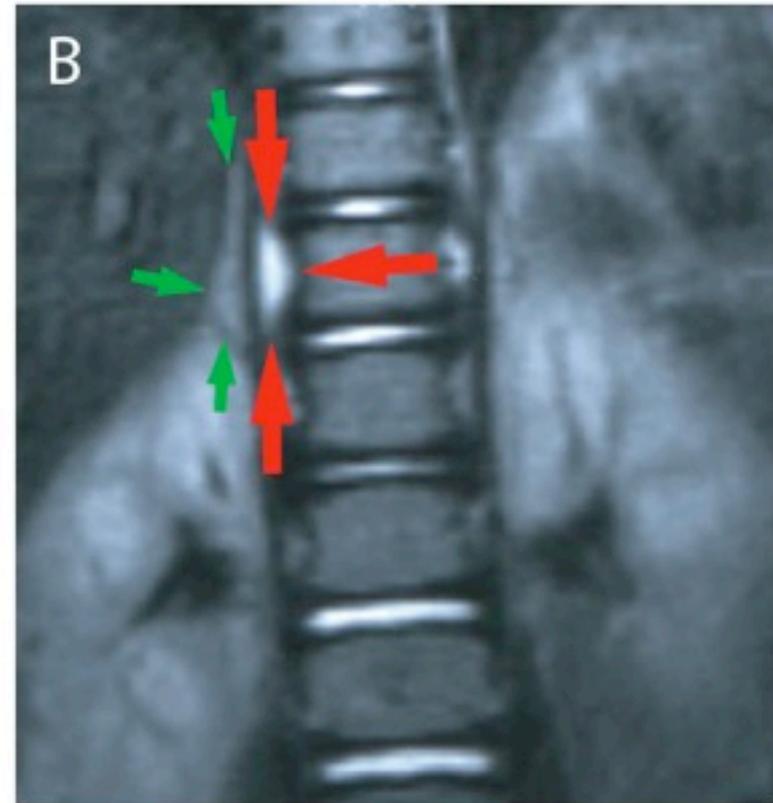
Spontane Regression der Leber-
und Hautmetastasen nach
Entfernung des Primärtumors



Primärtumor

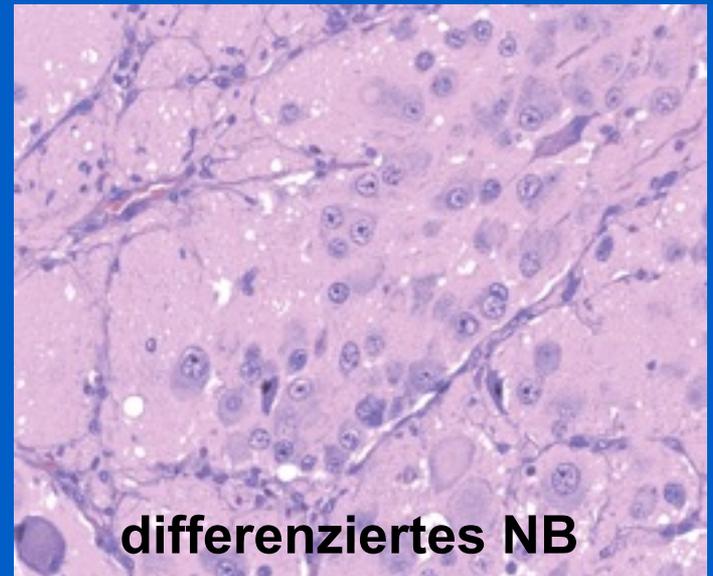
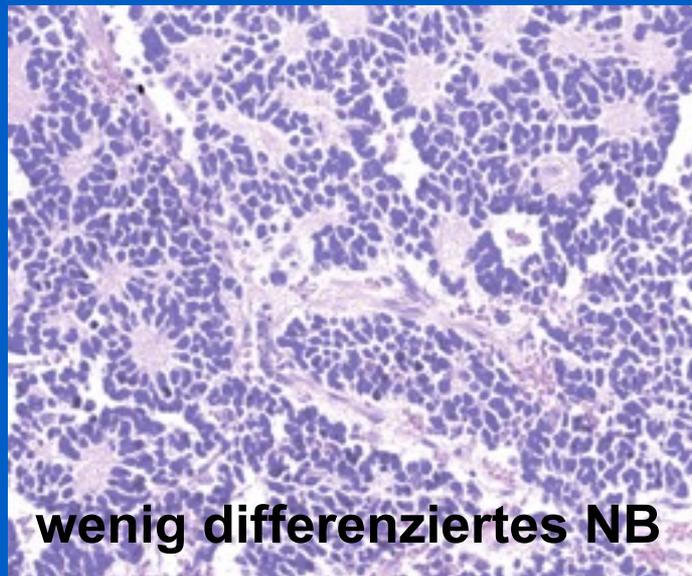
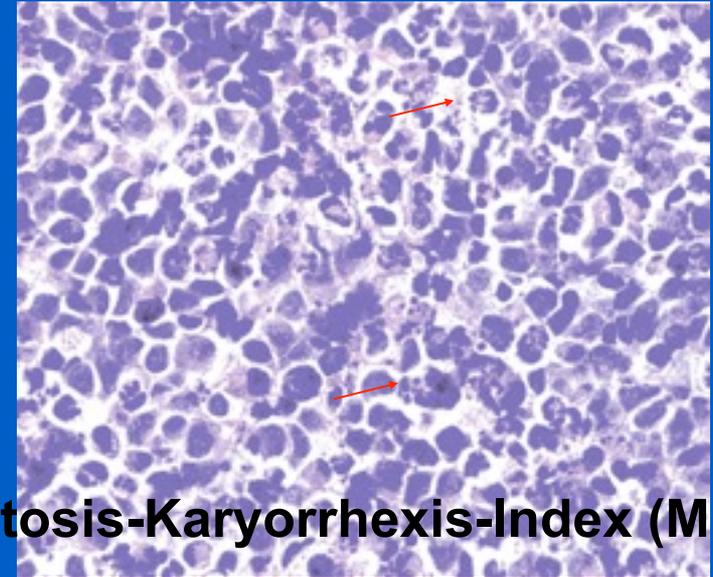
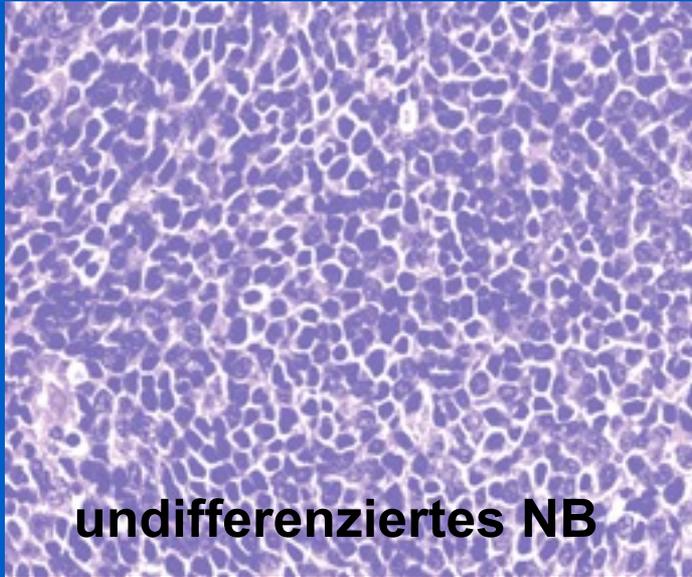
Spontaneous Regression

Stage 3

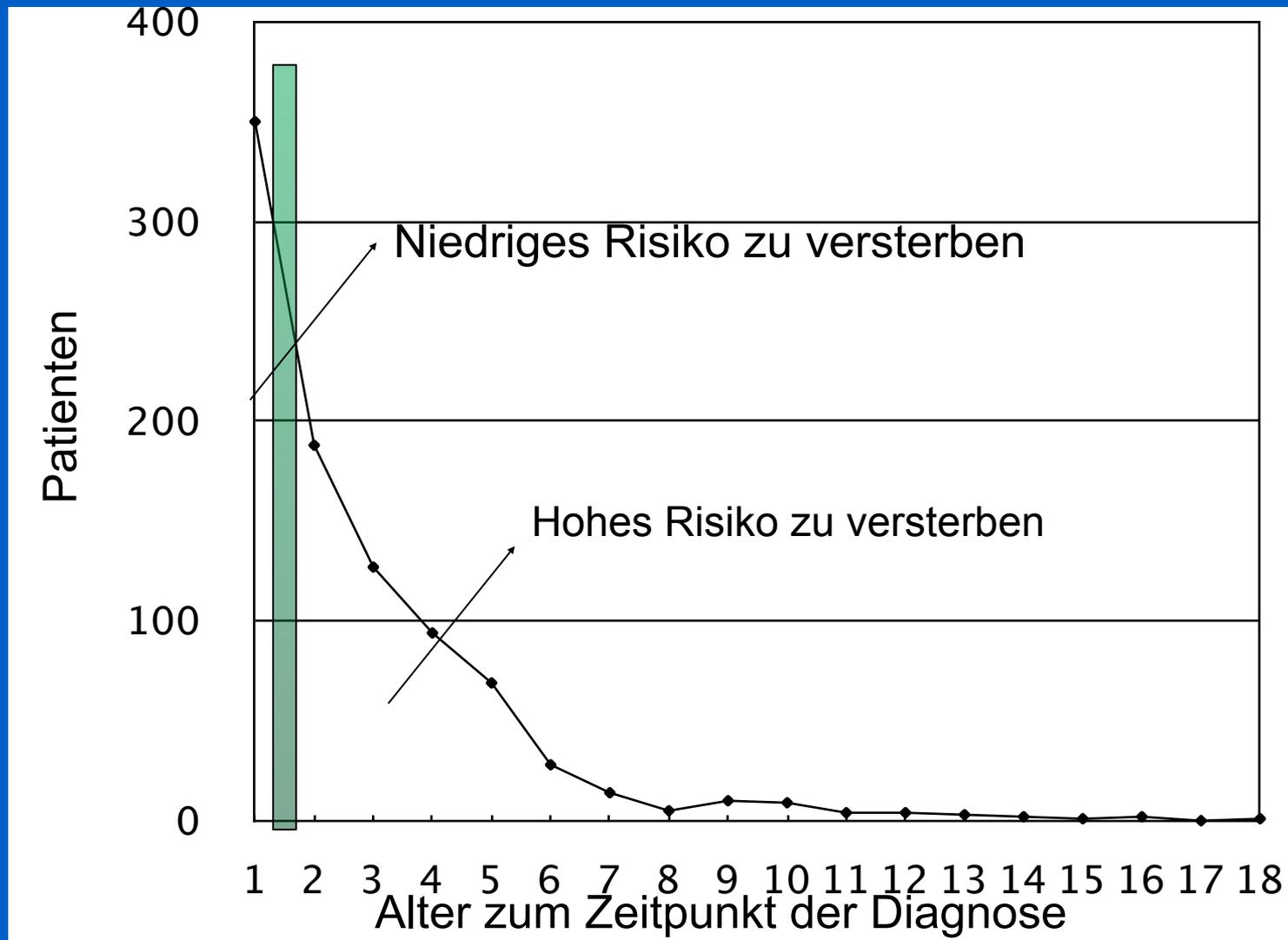


10 month without any cytoreductive therapy

Histopathologie (Shimada Klassifikation)

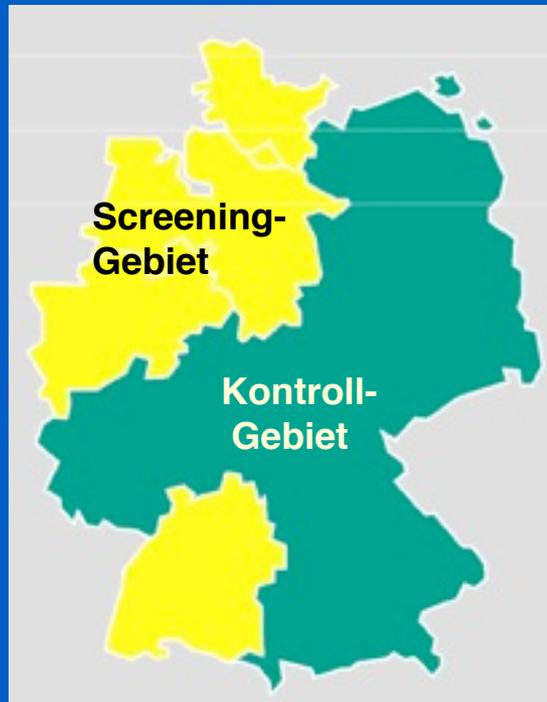


Alter zum Zeitpunkt der Diagnose



NB Früherkennung (Screening Studien)

Populations-basierte kontrollierte Studie (1994-1999) (Urin-Screening auf Katecholamine)



Anzahl der untersuchten Kinder:
1.477.630

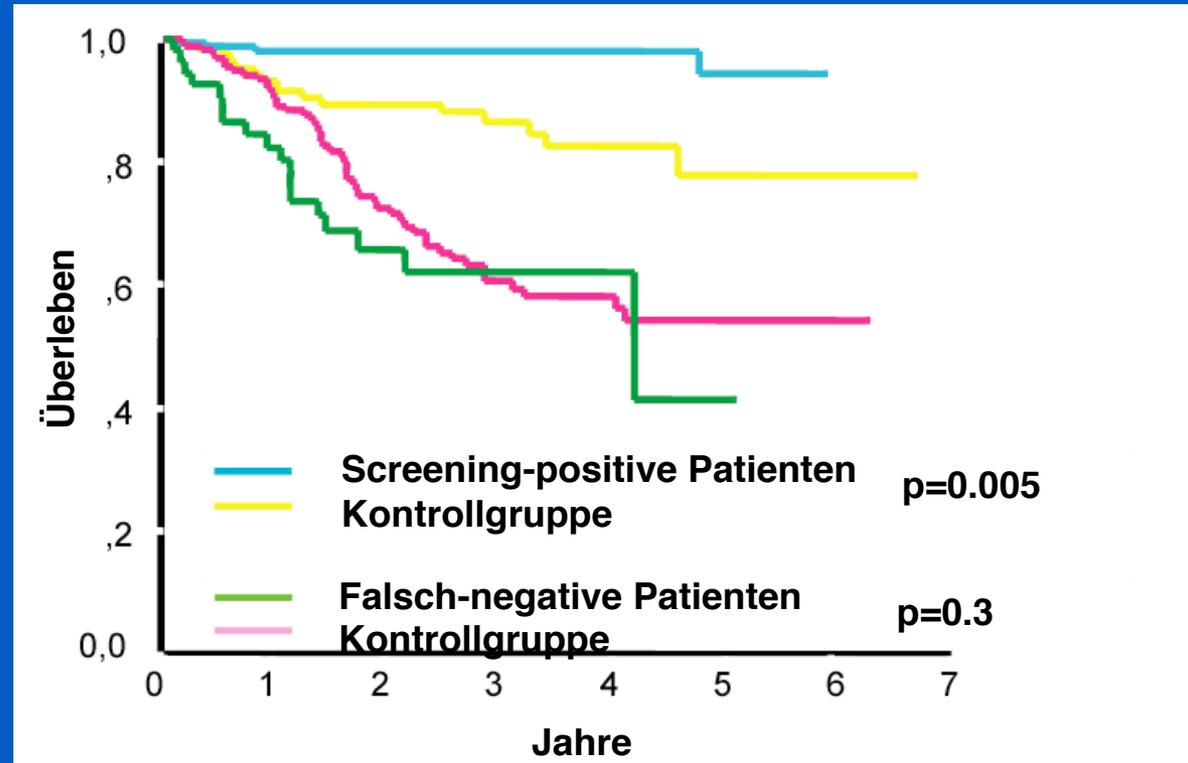
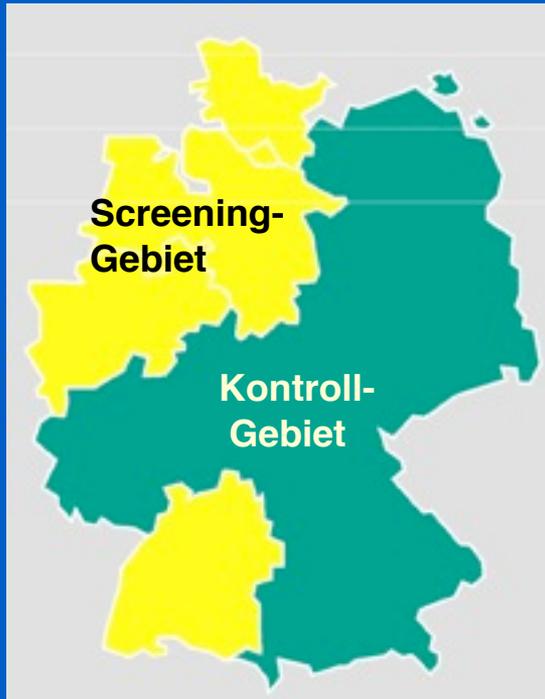
Rationale

Patienten mit aggressiver, biologisch ungünstiger Erkrankung und niedriger Überlebenswahrscheinlichkeit entstehen über die Zeit aus lokalisierten biologisch günstigen Tumoren

Ziele

1. Diagnose der Erkrankung zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung
2. Verbesserte Langzeit-Überlebenswahrscheinlichkeit

NB Screening Studie



Anzahl der untersuchten Kinder:
1.477.630

Durch das Screening gefundene Neuroblastome: 150

Falsch-negative Patienten 68 (-2002)

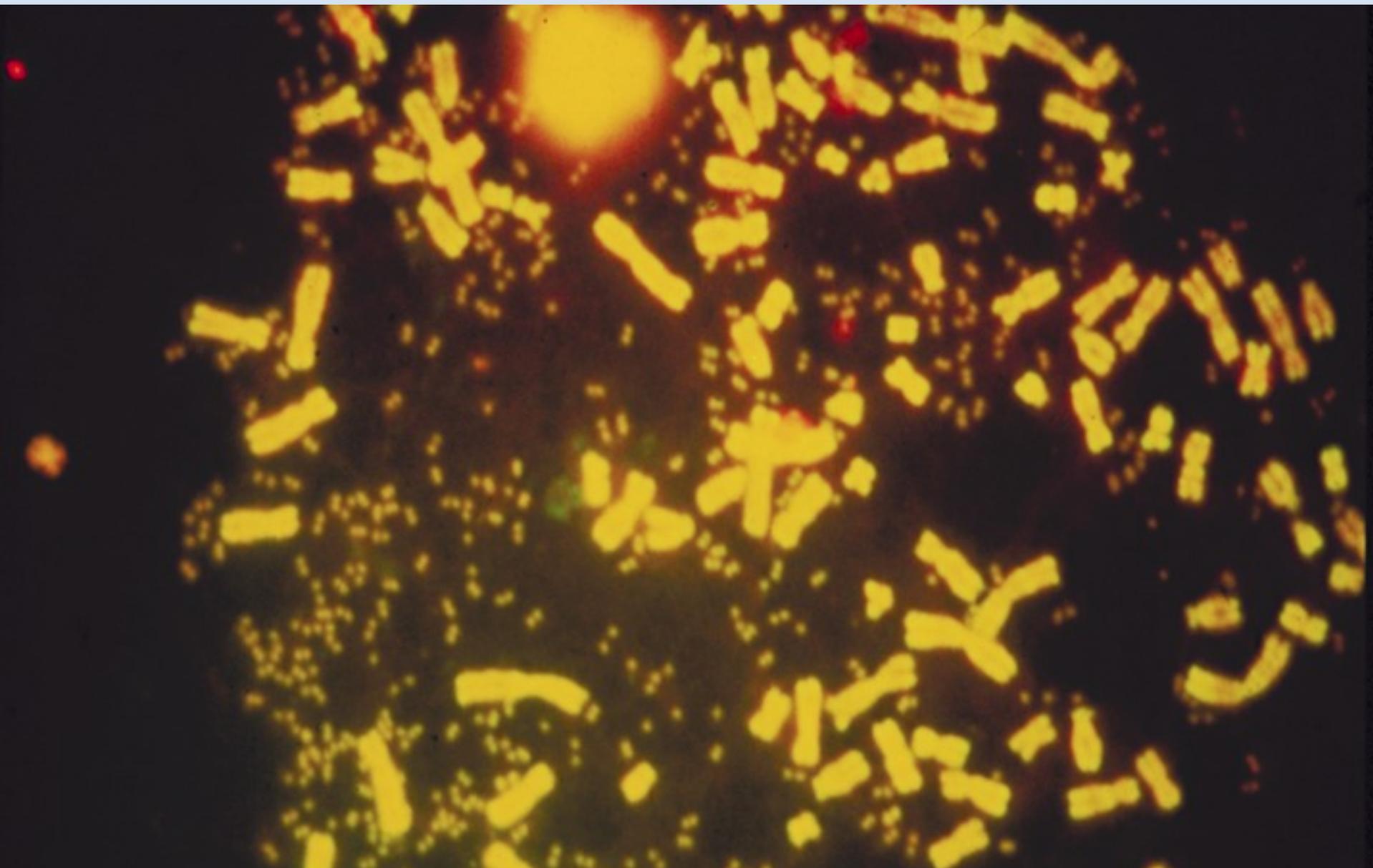
Überdiagnose (!)
Keine Reduktion der Mortalität

Genetische Marker: Zytogenetische Manifestationen amplifizierter DNA in Tumorzellen

dkfz.

Frank Westermann
Tumor Genetics

06/28/2010 | Seite



Montag, 28. Juni 2010

Genetische Marker: Zytopenetische Manifestationen amplifizierter DNA in Tumorzellen



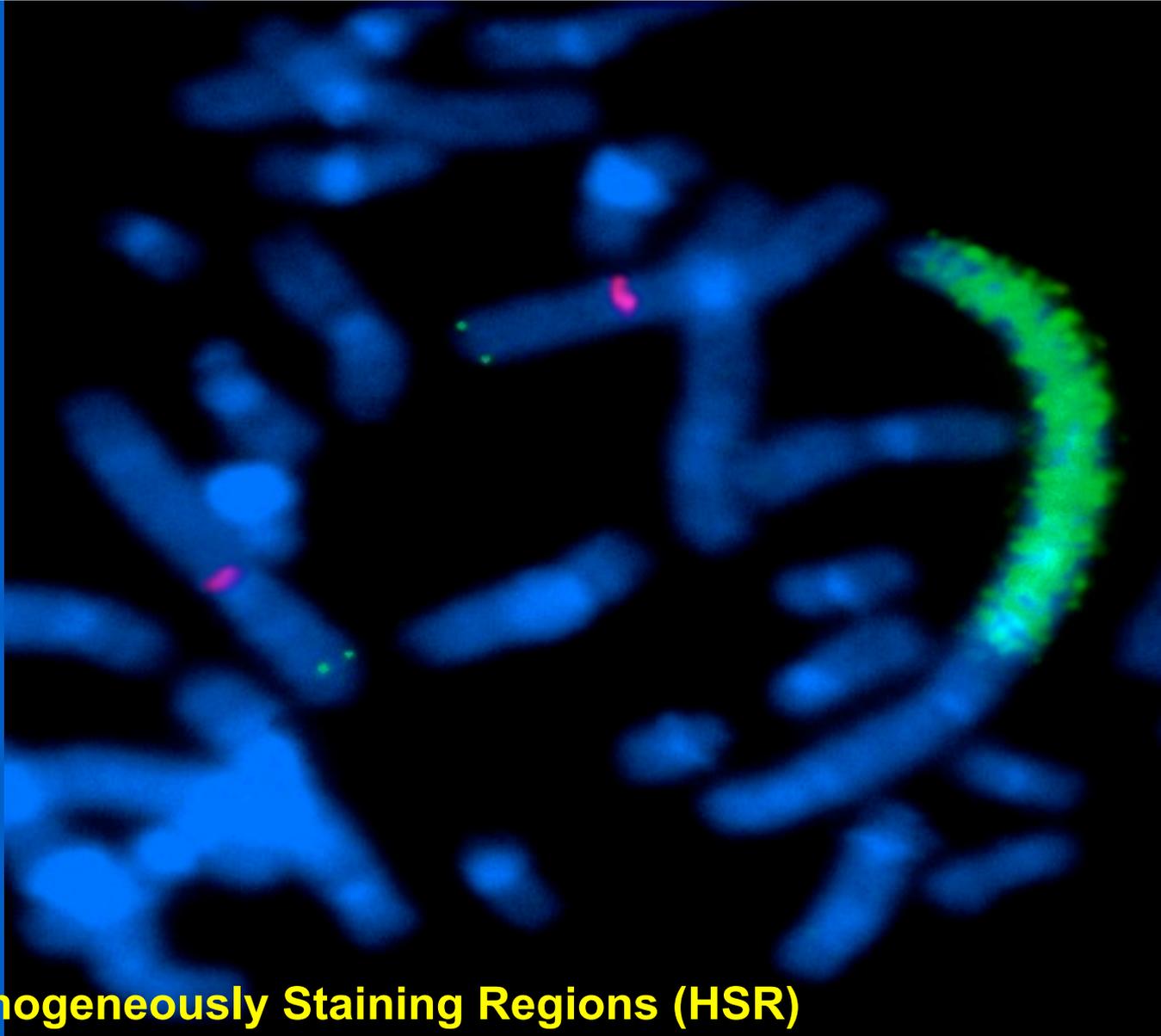
Homogeneously Staining Regions (HSR)

Genetische Marker: Zytogenetische Manifestationen amplifizierter DNA in Tumorzellen

Frank Westermann
Tumor Genetics

06/28/2010 | Seite

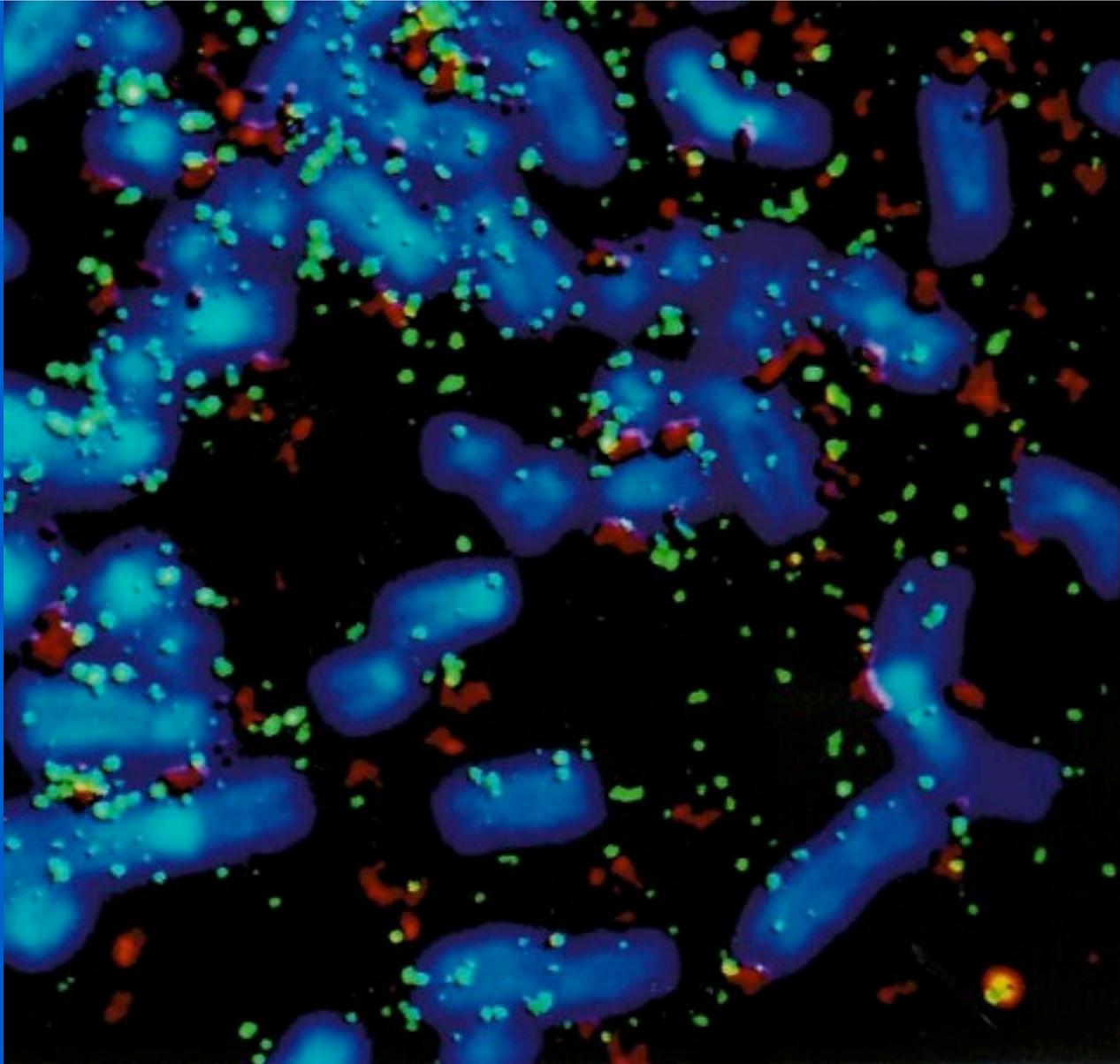
dkfz.



Homogeneously Staining Regions (HSR)

- *N-myc*, *MYCN*, *NMYC*; 2p23-24
- Amplifiziert in 20% der Neuroblastome und in der Mehrheit der NB Zelllinien
- Amplifizierte DNA umfaßt ca. 100 - 500 kb, selten mehr als 1 MB, und andere Gene können ko-amplifiziert sein
- Sporadisch können, *MDM2* und *CDK4* (12q14) auch amplifiziert sein
- Amplifiziertes *MYCN* ist assoziiert mit einer schlechten Prognose in allen Krankheitsstadien

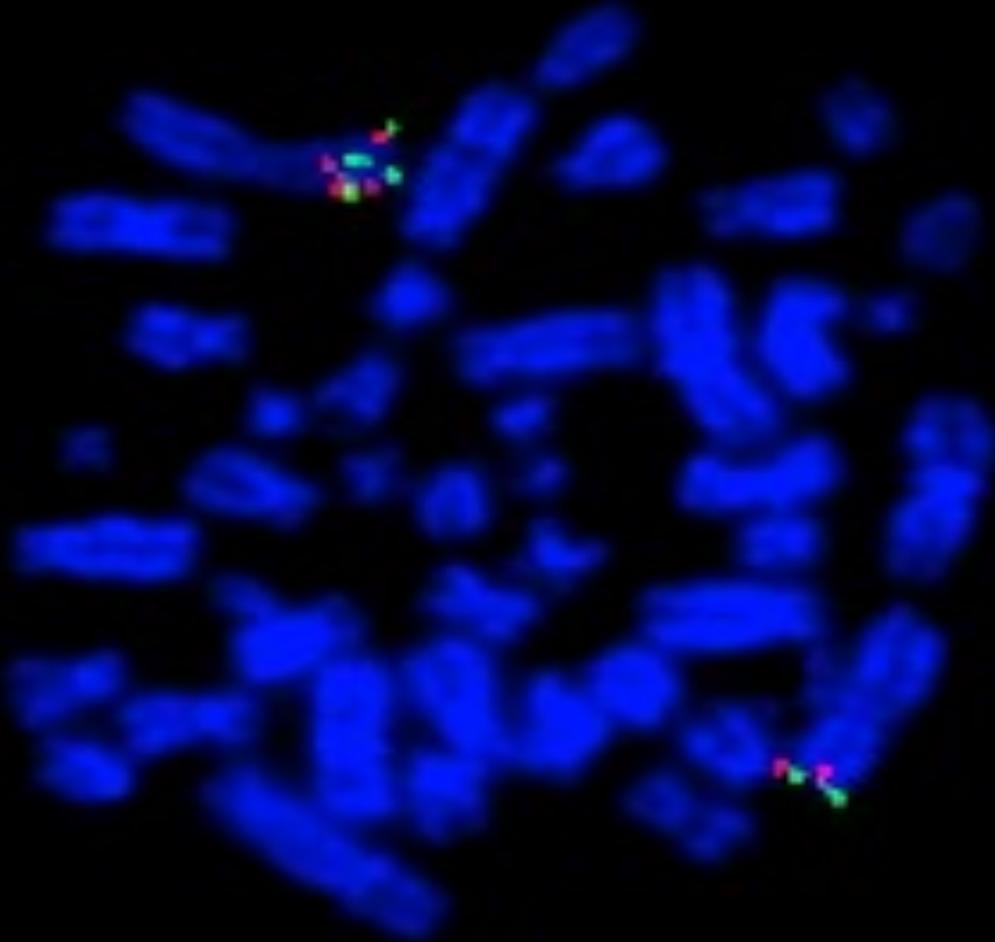
Amplifikation von *MYCN* (2p24) und *MDM2* (12q14)



MYCN=red
MDM2=green

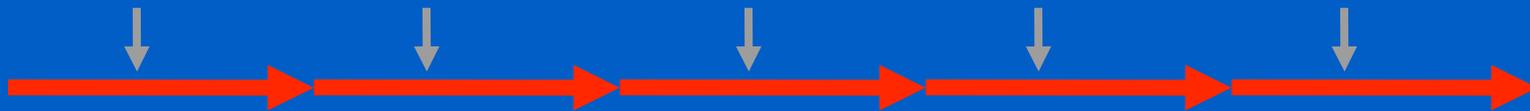
DMs

Duplikation des *MYCN* Locus in Neuroblastom Zellen

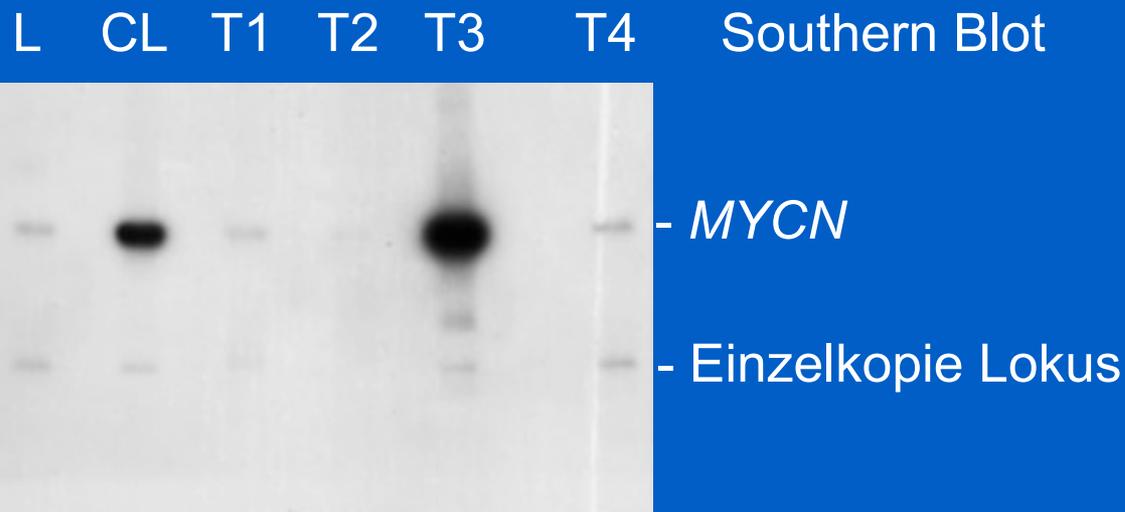


Struktur des *MYCN* Amplikons

Amplifizierte DNA ist in regelmäßigen Einheiten angeordnet
(head-to-tail tandem repeats of unit length)



↓ Seltene *NotI* Restriktionsstelle in einer CpG-Insel von *MYCN*



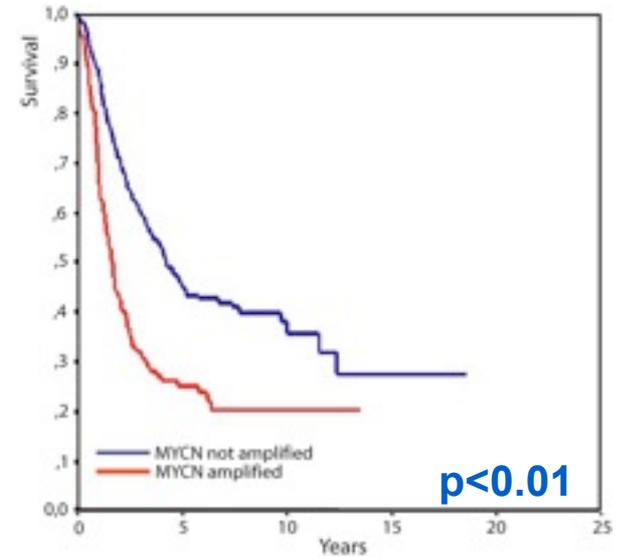
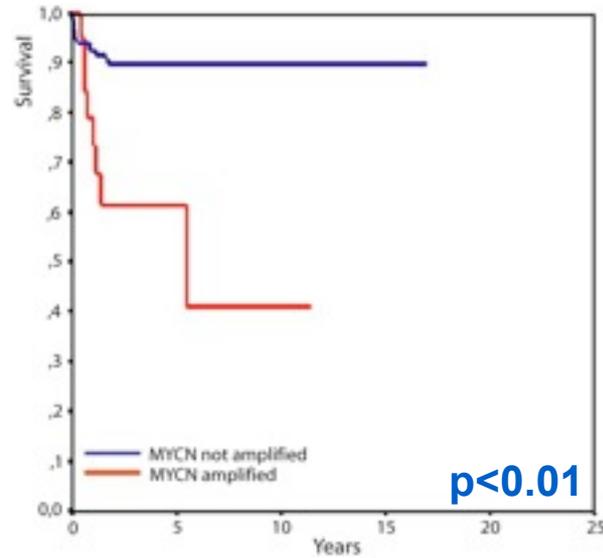
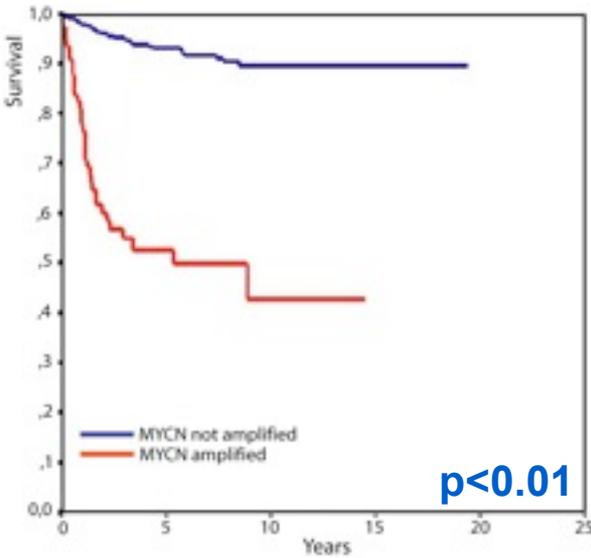
Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des *MYCN* Onkogen-Status



Stage 1-3

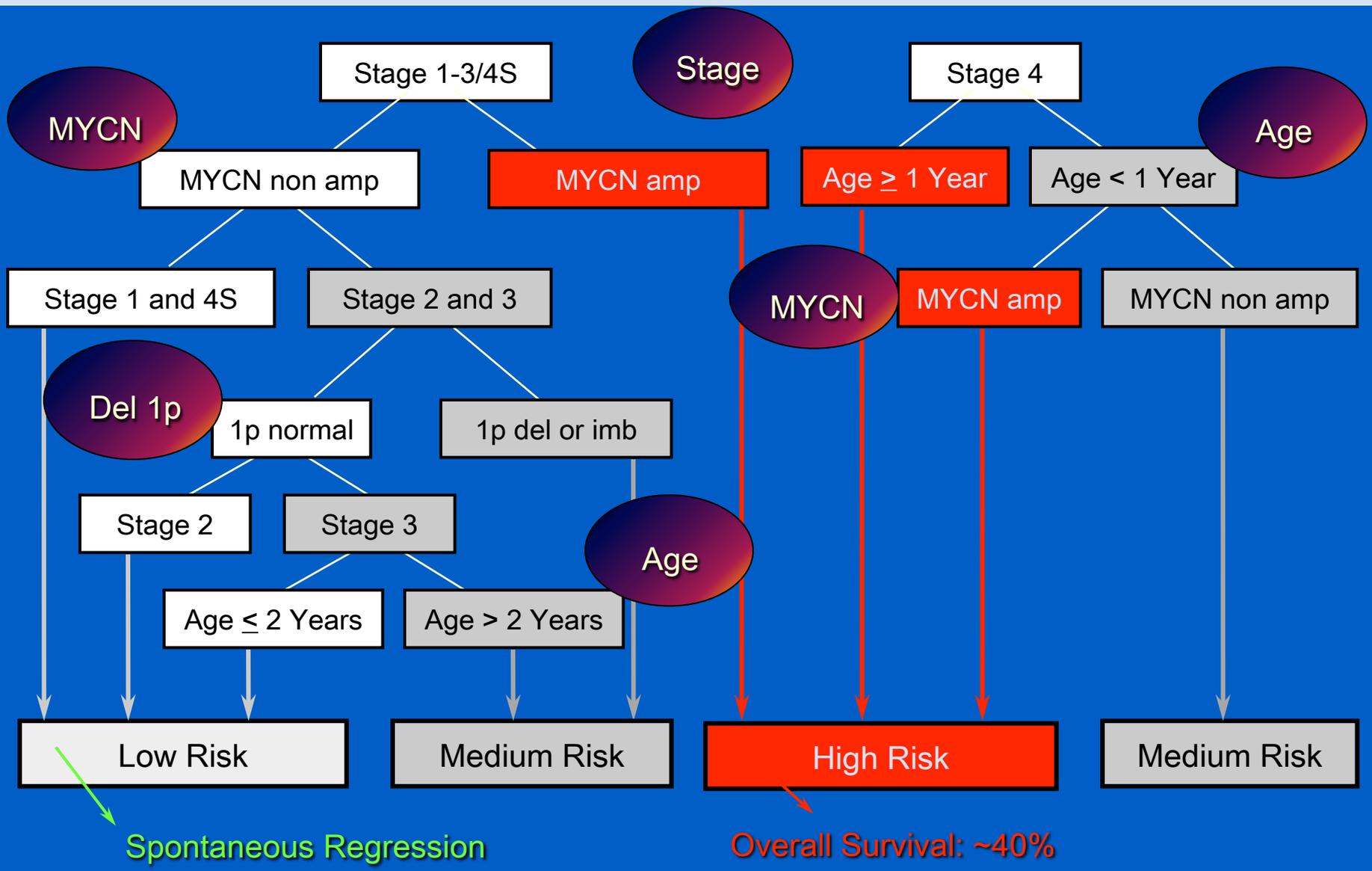
Stage 4s

Stage 4



n=1706

Risiko-Stratifizierung: Studie NB2004 (Deutschland)



Vergleich der NB Risiko-Stratifizierung: Deutschland, USA, Japan

Low-Risk Group				
Country	Stage	Age	Mycn	other
Germany	1,4S	any	normal	
	2	any	normal	1p normal
	3	< 2years	normal	1p normal
COG	1	any	any	
	2	< 1y	any	
	2	1-21y	normal	Shimada favorable
	4S	< 1y	normal	Shimada favorable and DNA hyperdiploid
Japan	1,2,3,4S	< 1y	normal	
	1.2	> 1y	normal	

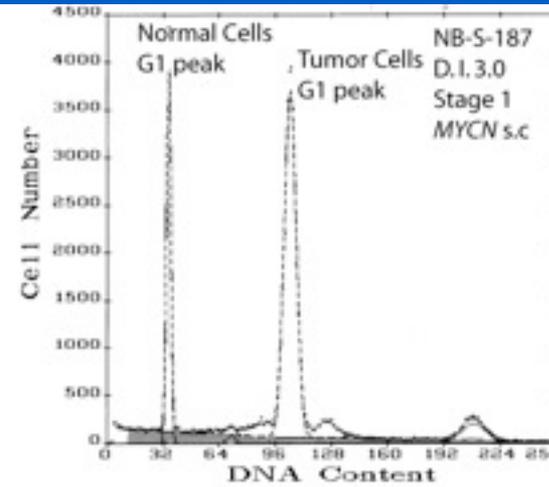
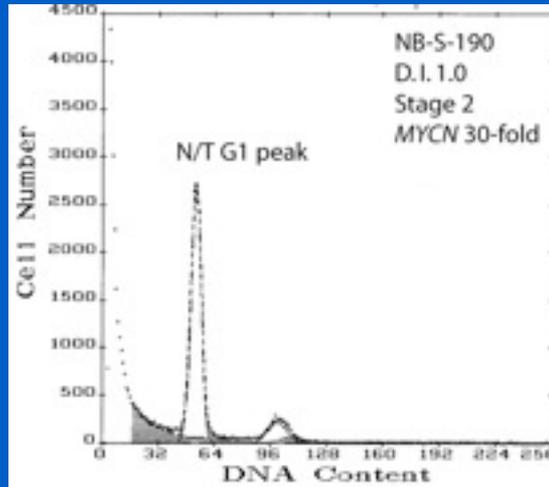
Intermediate-Risk Group				
Country	Stage	Age	Mycn	other
Germany	2.3	any	normal	
	3	> 2y	normal	1p deleted
	4	< 1y	normal	
COG	3	< 1y	normal	
	3	1-21y	normal	Shimada favorable
	4	< 1y	normal	
	4S	< 1y	normal	Shimada unfavorable or DNA diploid
Japan	3	> 1y	normal	
	4	< 1y	normal	

High-Risk Group				
Country	Stage	Age	Mycn	other
Germany	any	any	amplified	
	4	> 1y	any	
COG	2	1-21y	amplified	Shimada unfavorable
	3	1-21y	normal	Shimada unfavorable
	3,4,4S	any	amplified	
	4	1-21y	any	
Japan	any	any	amplified	
	4	> 1y	any	

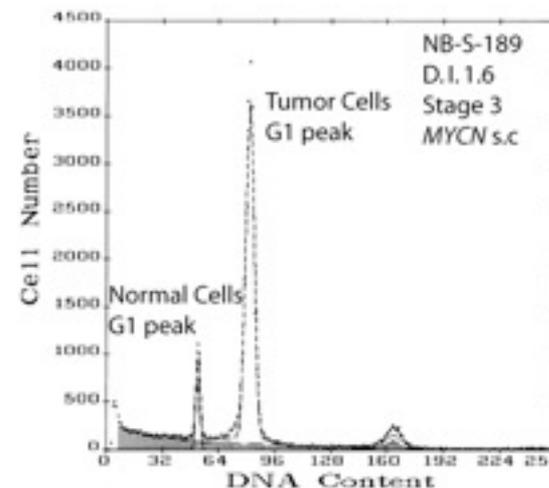
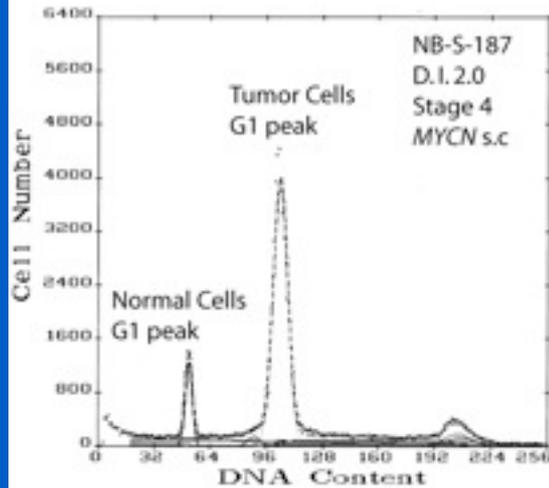
- Germany: *MYCN*, Age at Diagnosis, Stage, 1p Deletion (FISH)
- USA (COG): *MYCN*, Age at Diagnosis, Stage, Shimada, Ploidy
- Japan: *MYCN*, Age at Diagnosis, Stage

Ploidie der Tumorzellen

Diploid



Pentaploid
und höher

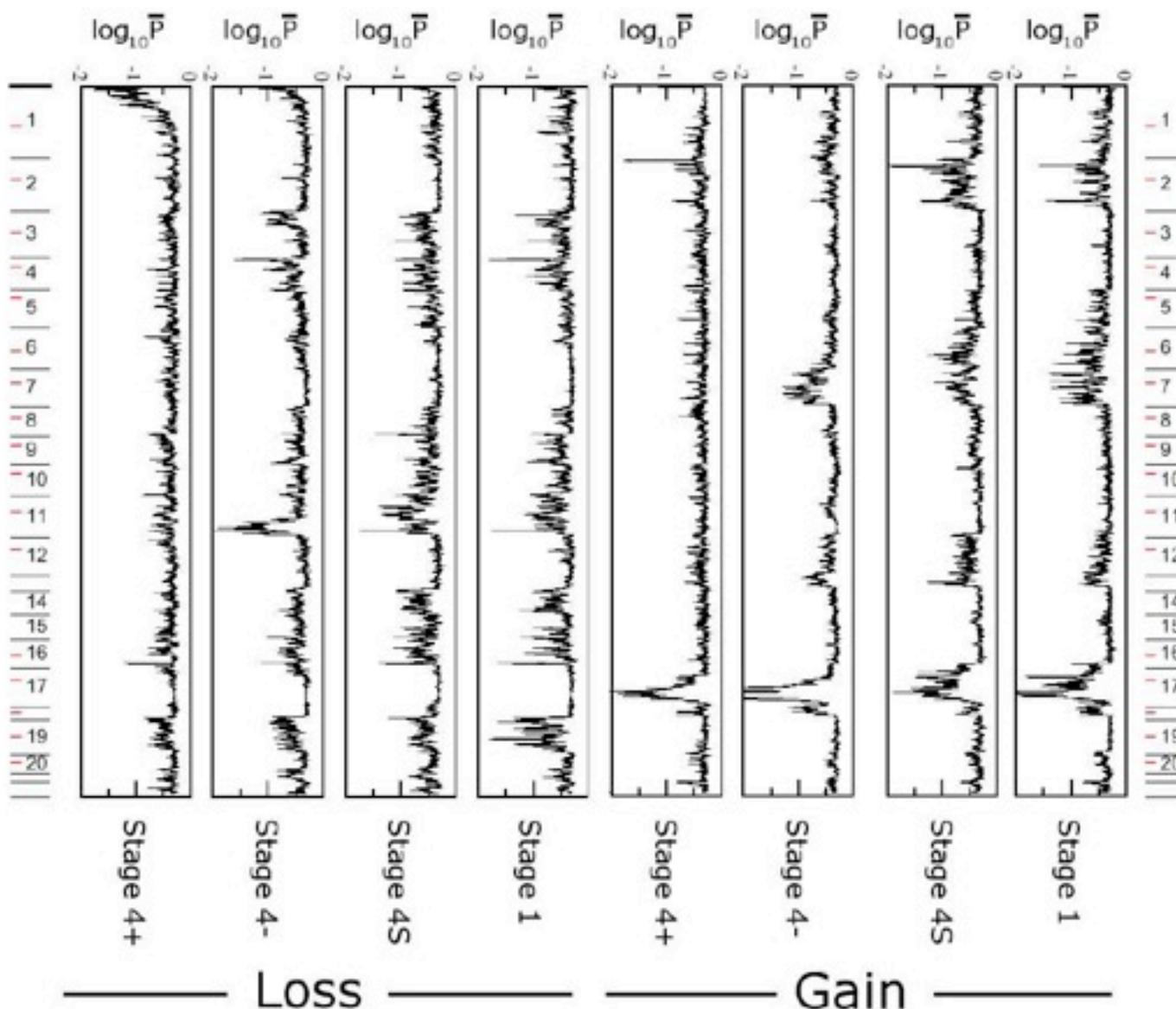


Triploid

Hoch-Risiko

Niedrig-Risiko

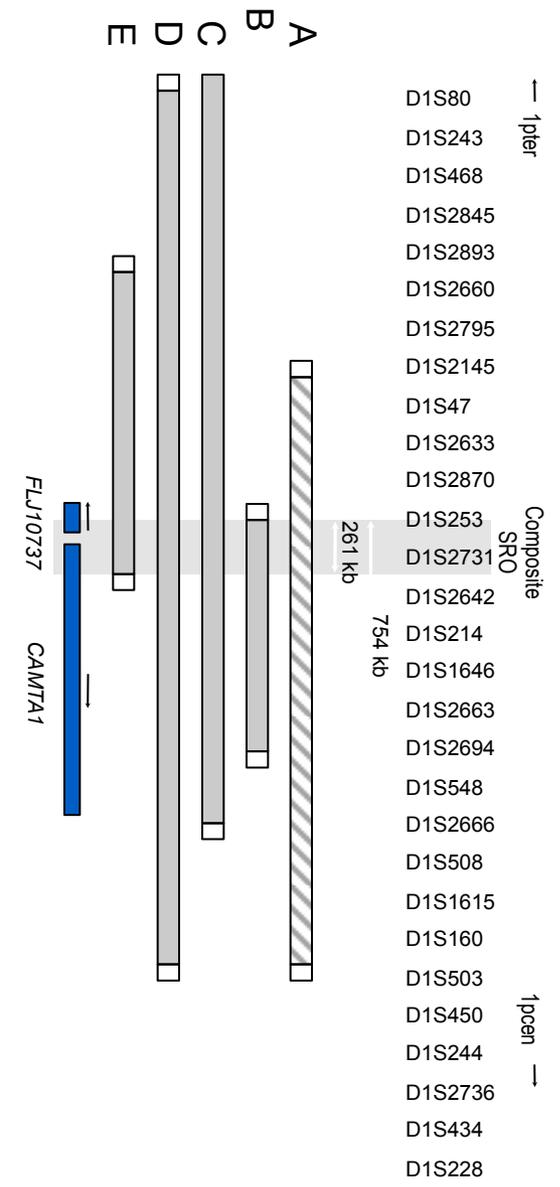
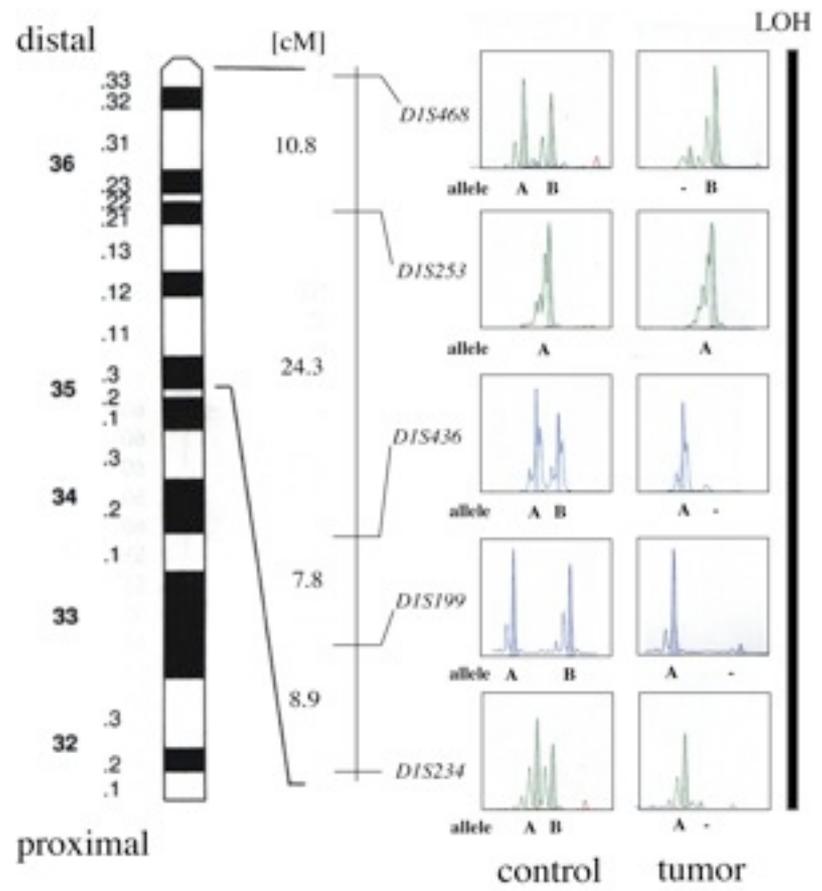
DNA Zugewinn bzw. Verlust



**Genomweite
Analyse:
Array-CGH
Stadium 1=20
Stadium 4s=17
Stadium 4+=18
Stadium 4-=21**

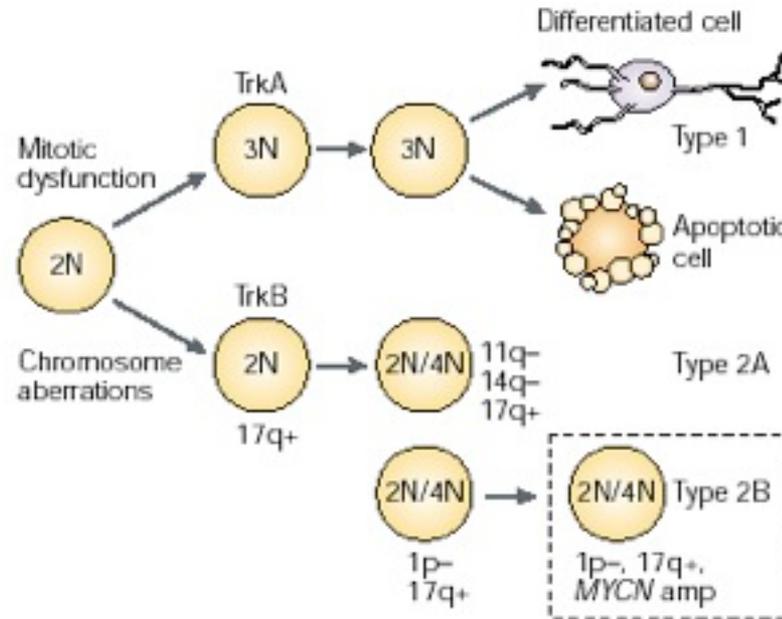
Nicht-zufällige 1p Deletionen: Hinweis auf 1 oder mehrere Tumor Suppressor Gene?

Verlust der Heterozygotie (LOH): 1p36

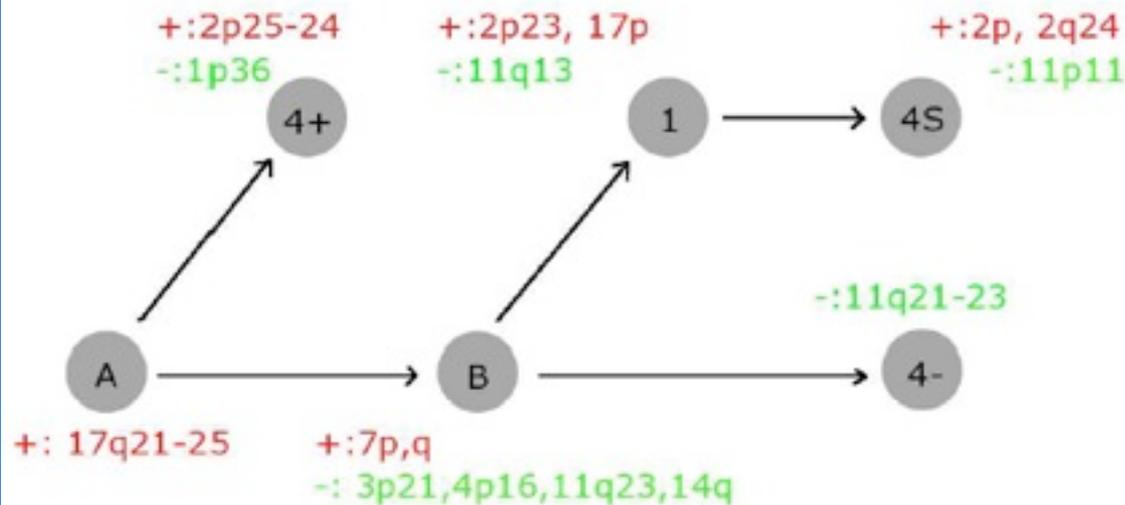


NB Progressionsmodell basierend auf genomischen Daten

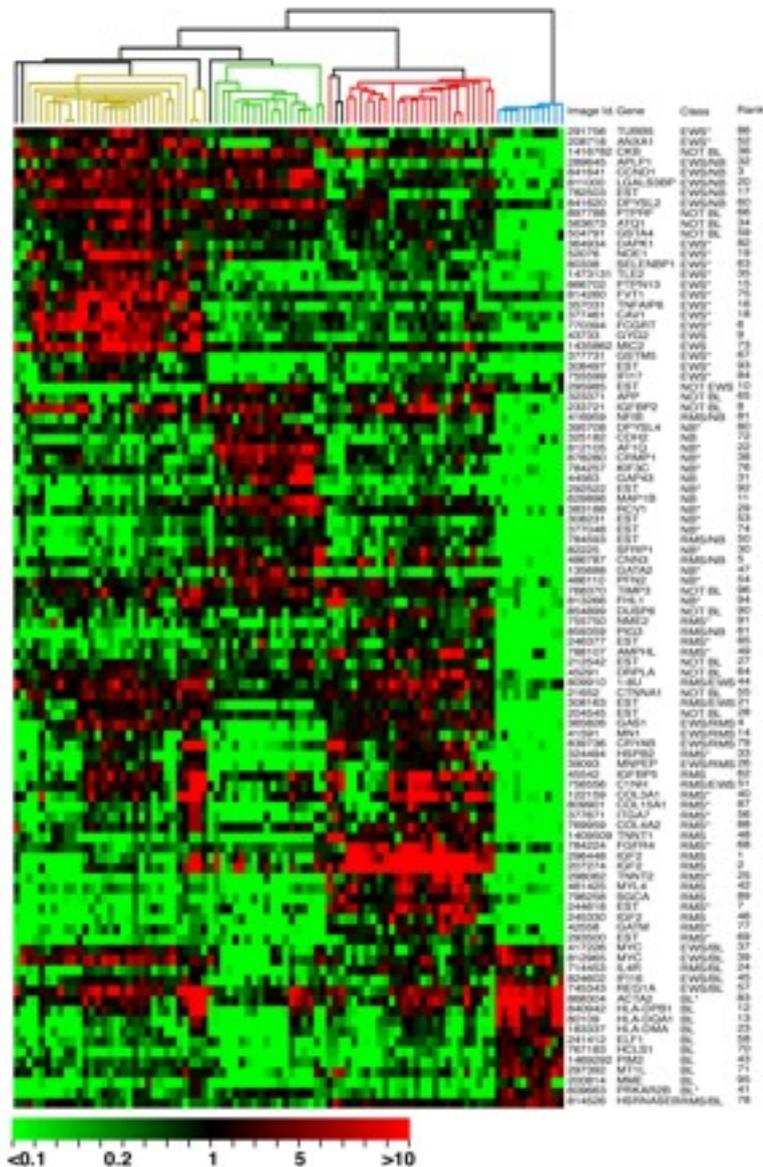
Model 1



Model 2



Genexpressionsprofile von NB Zellen



Klassifizierung von "small, round blue-cell" Tumoren (SRBTs) mittels Genexpressionsprofilen:
Neuroblastom (NB),
Rhabdomyosarcom (RMS),
Ewingsarkom (EWS), and non-Hodgkin
Lymphome(NHL)

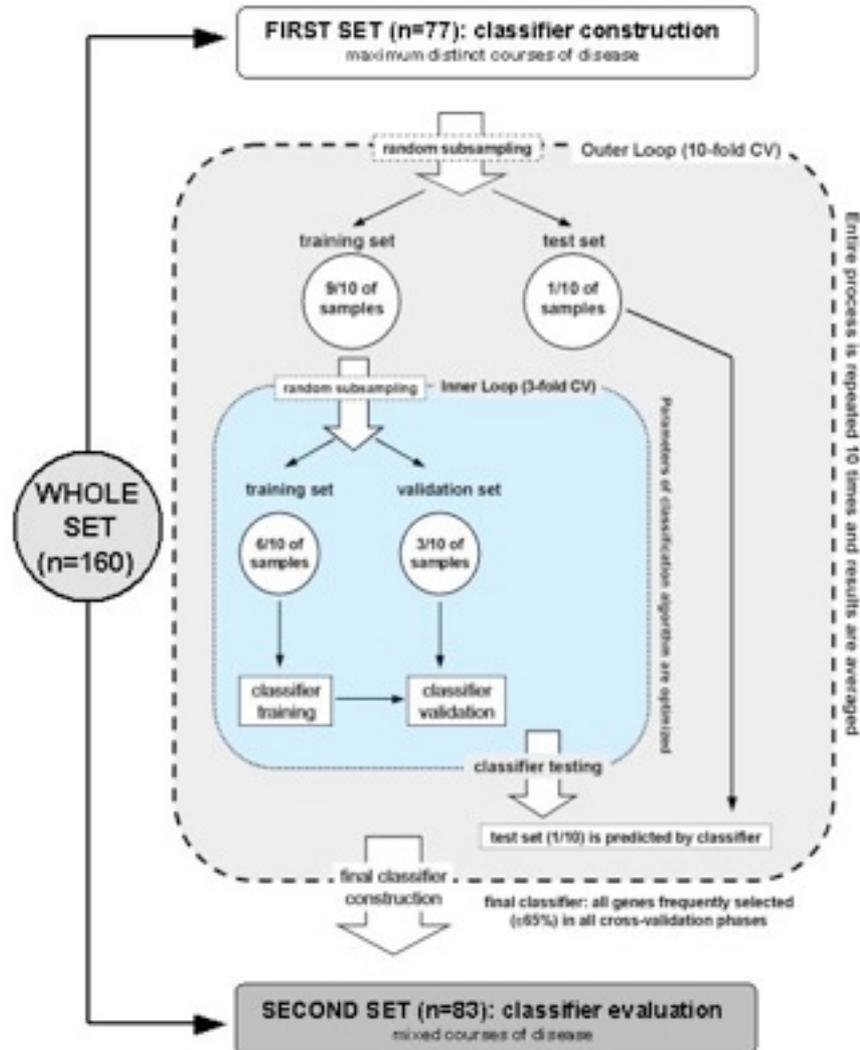
50.000 und mehr
Datenpunkte pro
Analyse bzw. Tumor

Ca. 50-100 (200)
Patienten pro Studie

Genexpressionsprofile NB Subtypen: Experimentelle Strategie

Test-Set
Validierungs-Set

Figure 1B



Experimentelle Strategie

Figure 1B

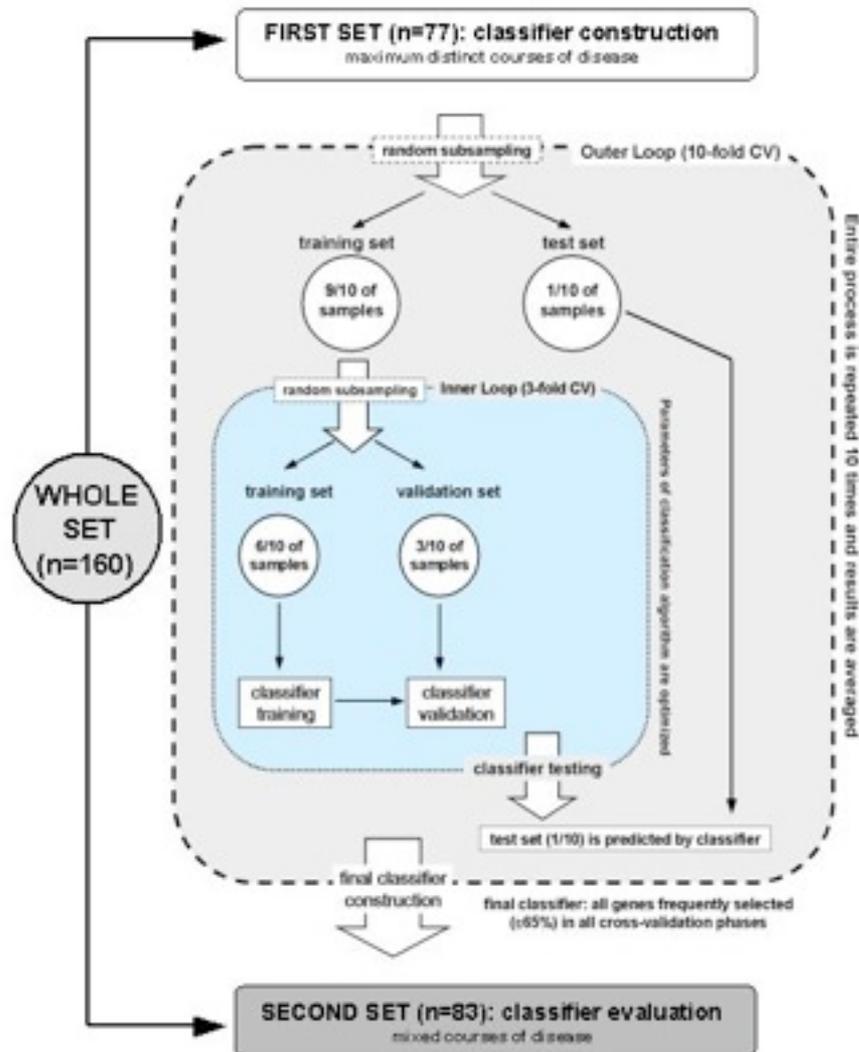
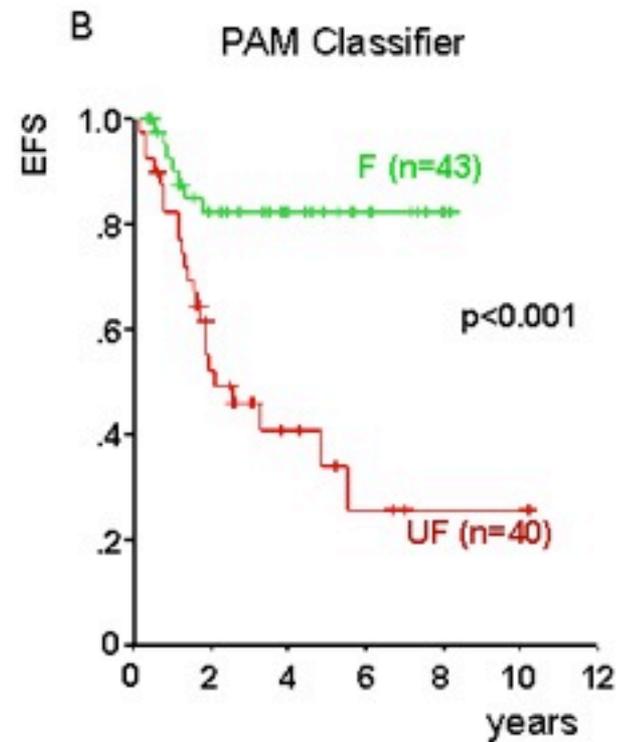
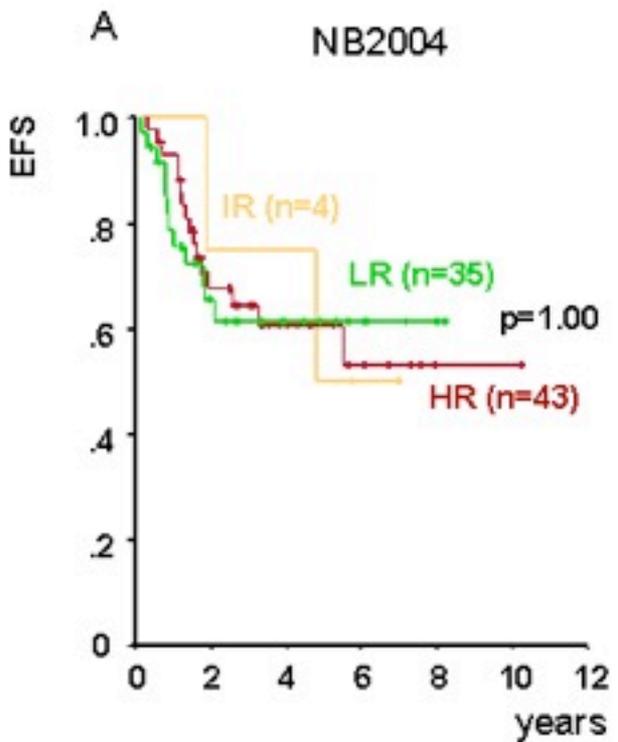
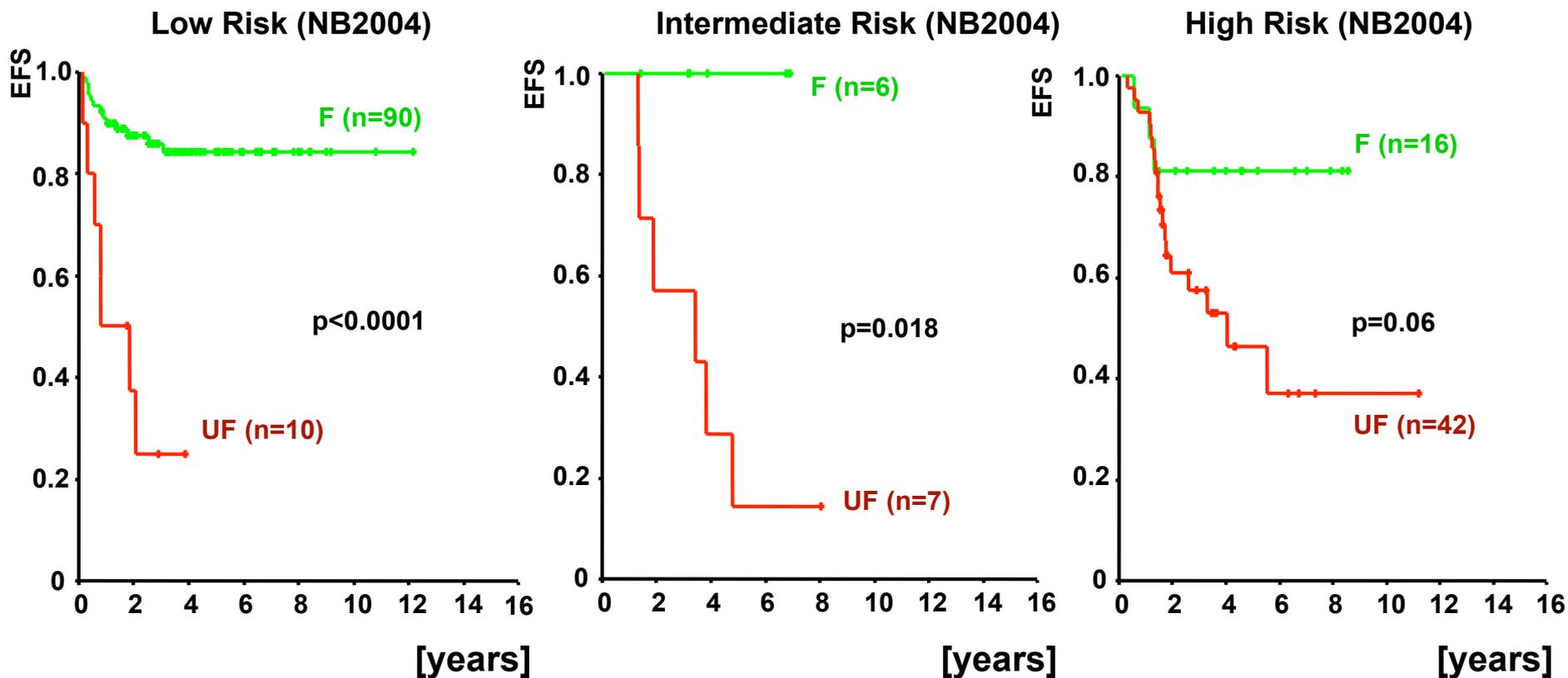


Figure 2

Bisheriges Verfahren

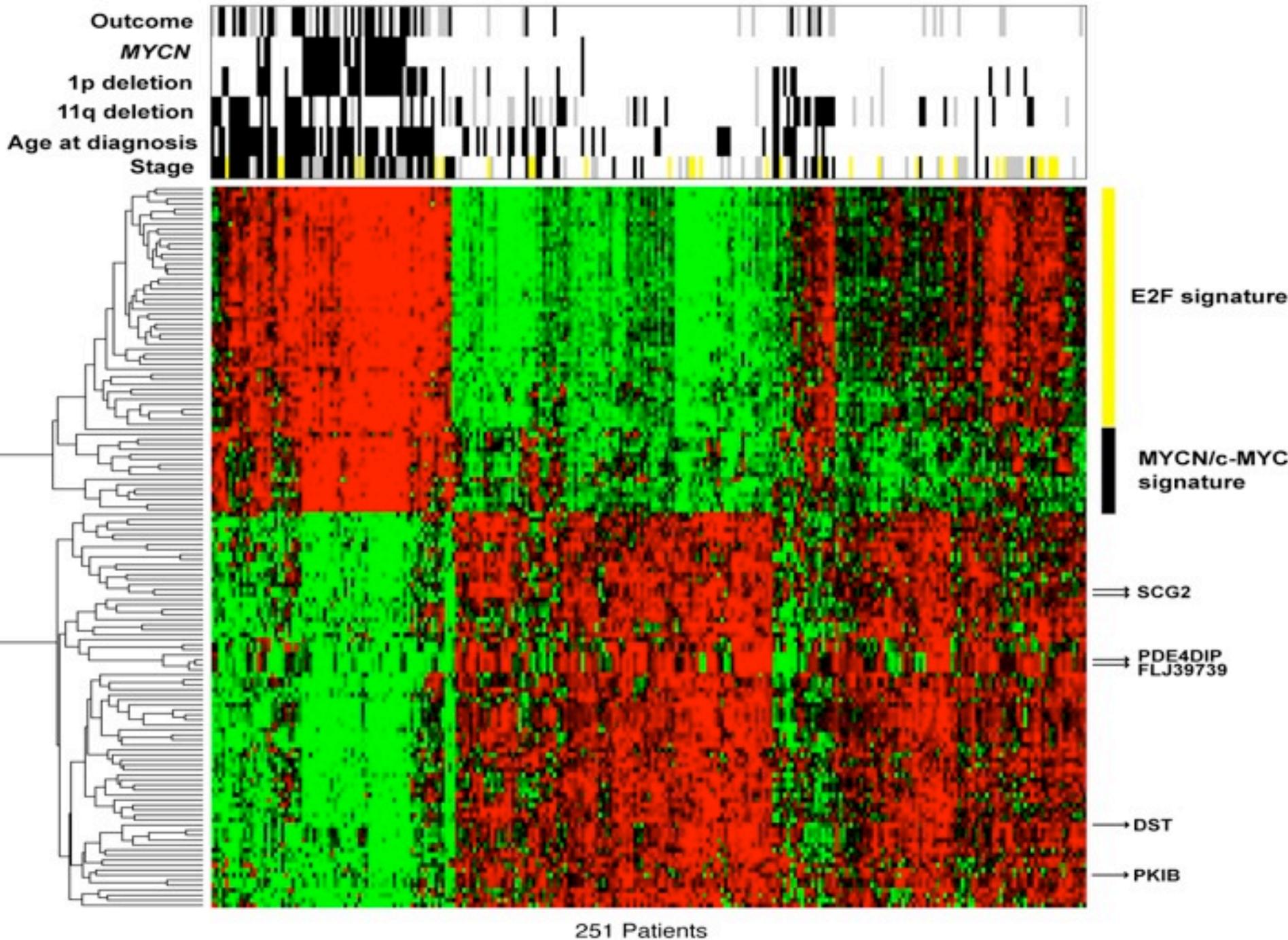
Genexpressionsprofile





Single Marker	p-value	Hazard Ratio [95% CI]
Age (continuous)	0.159	
Stage (1-3, 4S vs. 4)	0.775	
MYCN (normal vs. amp)	0.299	
Status 1p (normal vs. del/imb)	0.658	
Shimada (F vs. UF)	0.043	2.284 [1.0002-5.205]
PAM Classifier (F vs. UF)	0.004	3.318 [1.428-7.708]

Trial	p-value	Hazard Ratio [95% CI]
NB2004 (Germany) (LR vs. IR vs. HR) <i>(stage, age, MYCN, del1p)</i>	0.646	
Japan (LR vs. IR vs. HR) <i>(stage, age, MYCN)</i>	0.518	
COG (USA) (LR vs. IR vs. HR) <i>(stage, age, MYCN, ploidy, Shimada)</i>	0.350	
PAM F vs. UF	<0.0001	4.756 [2.544-8.893]

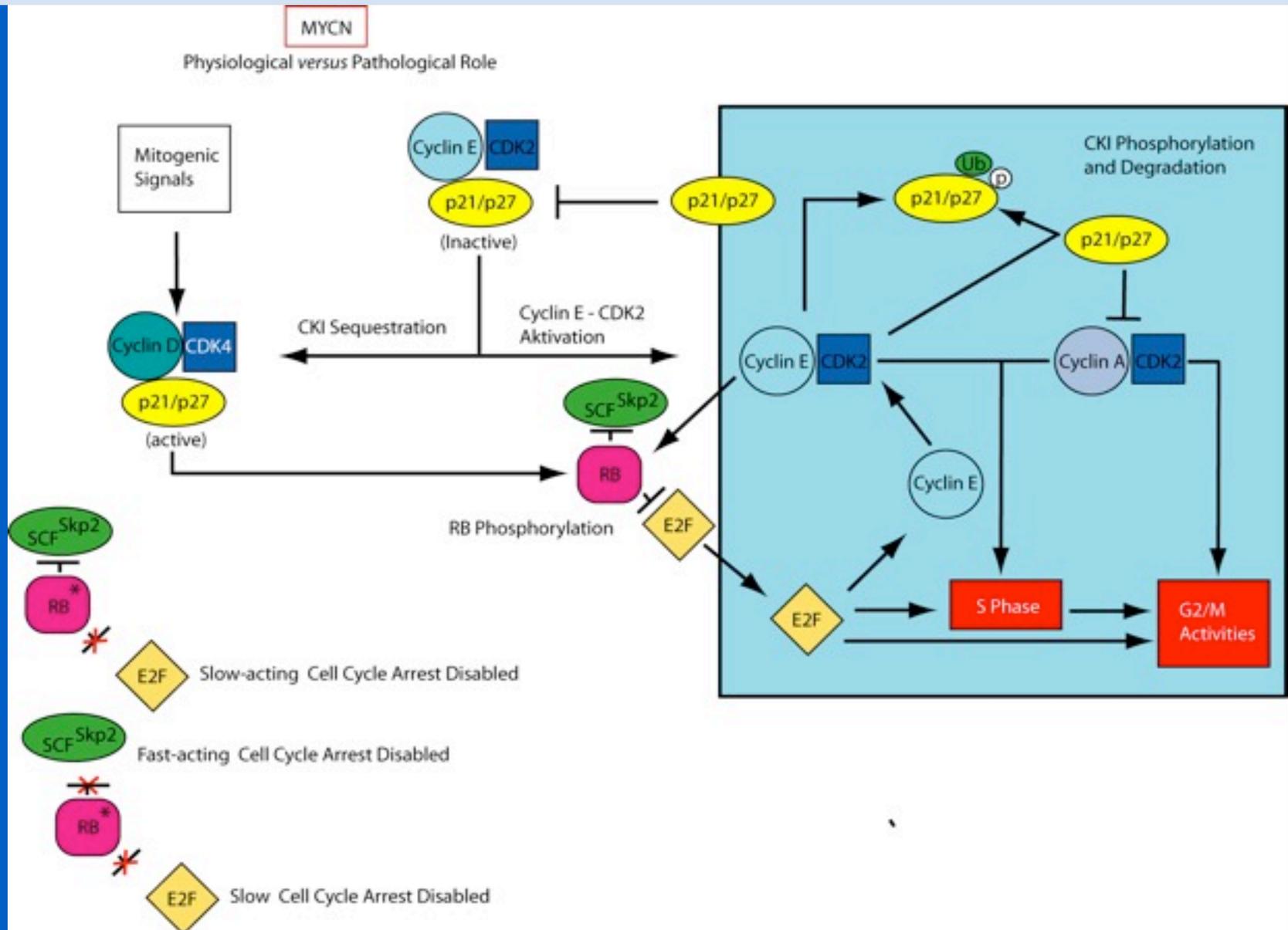


- Ein Genom für 1000\$
- Cancer Genome Project (ICGC)
- 30.000-40.000 Mutationen in einem „Tumor“
- „Driver“ bzw. „Passanger“ Mutationen

Nature. 2010 Apr 15;464(7291):993-8.

ENDE
Vielen
Dank!

Deregulated E2F activity in NB Progression

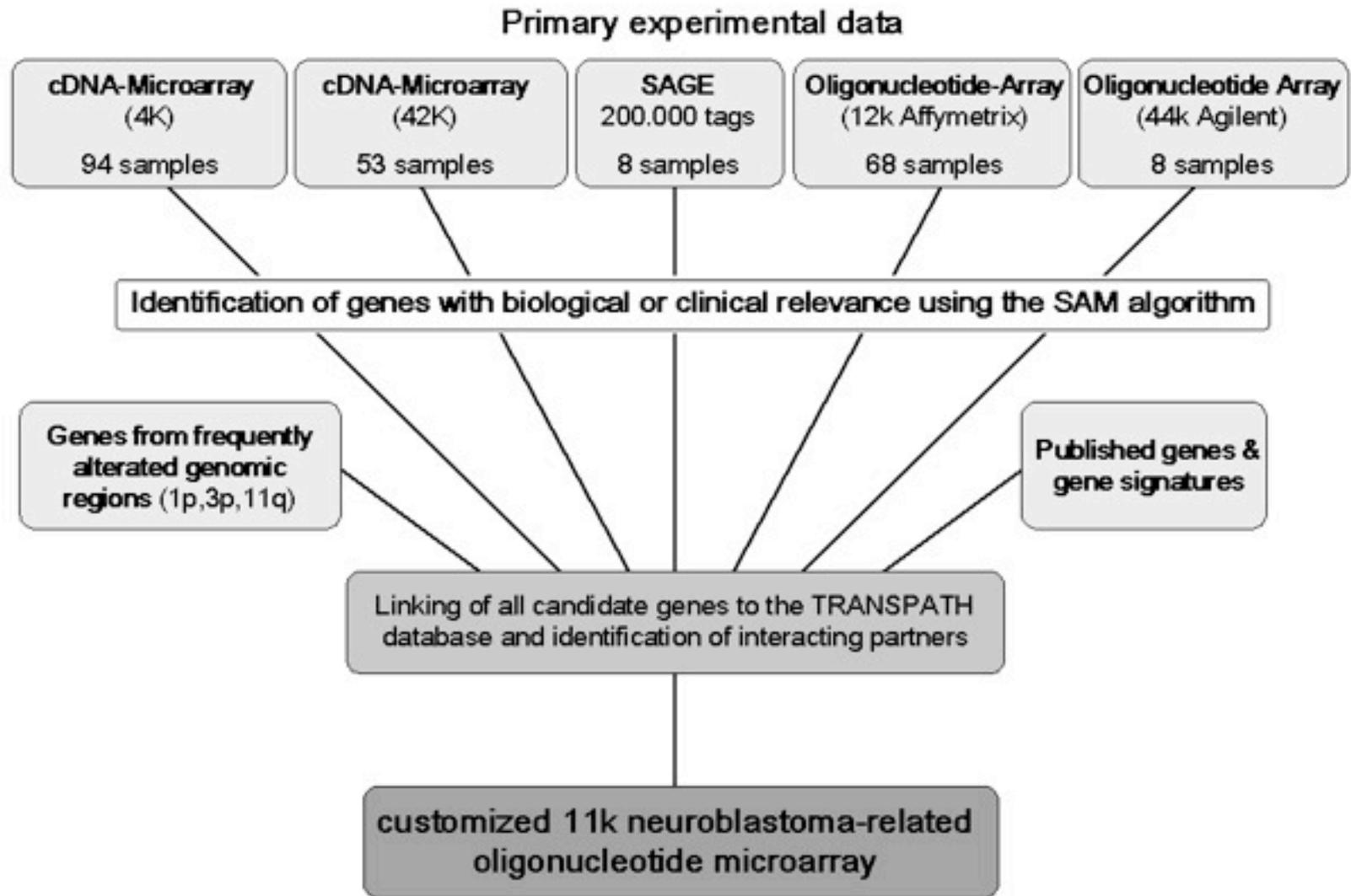


In vitro Models of NB

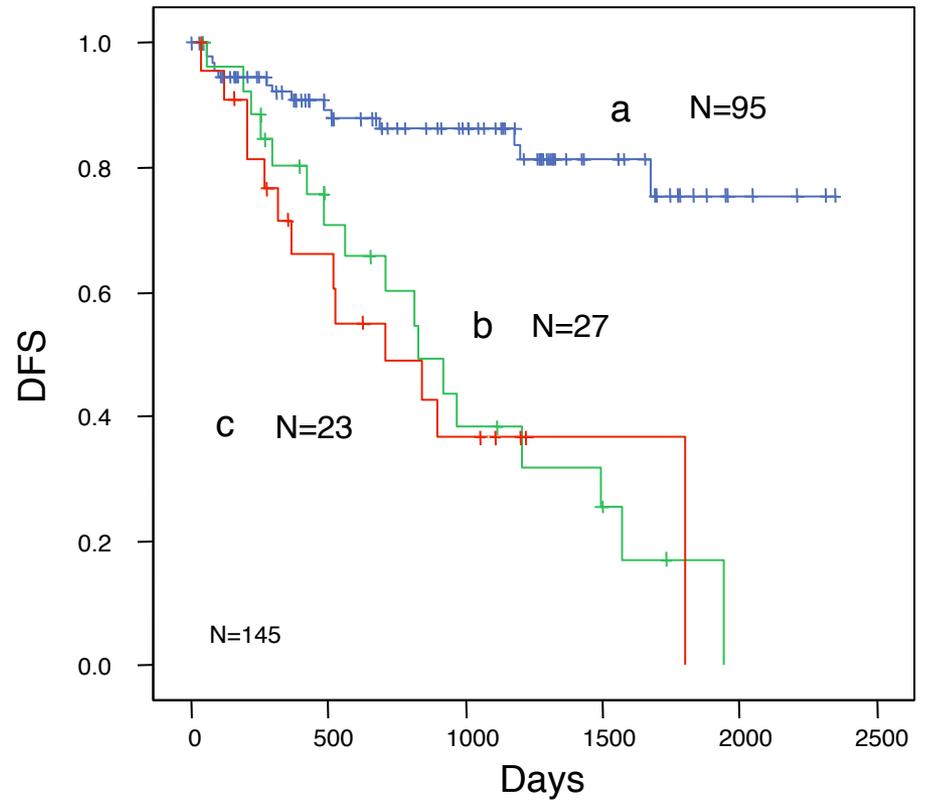


Construction of the Neuroblastoma-Chip

Figure 1A



CIMP Phenotype



Hierarchische Kluster-Analyse mit 144 Klassifizierungsgenen

Figure 2C

