

Molekulare Charakterisierung von Osteosarkomen

Osteosarkome sind die häufigsten primär malignen Knochentumoren und betreffen in erster Linie die Metaphysen der langen Röhrenknochen junger Erwachsener [12]. Es handelt sich in der Regel um aggressive High-grade-Tumoren, die bei ausschließlicher chirurgischer Therapie in über 90% der Fälle zu Lungenmetastasen und zum Tod der Patienten führen [4].

Hintergrund

Ein High-grade-Osteosarkom gilt zum Zeitpunkt der Diagnose als systemische Erkrankung, die in der Mehrzahl der Fälle nur mit Hilfe einer neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie in Kombination mit radikaler Resektion heilbar ist. Als Goldstandard für die prognostische Einschätzung gilt immer noch das Anfang der 80er Jahre etablierte „tumor mapping“, bei dem eine Scheibe durch den größten Tumordurchmesser des Resektats nach neoadjuvanter Therapie vollständig histologisch aufgearbeitet und auf residuelle Tumorfibrillen untersucht wird (Abb. 1; [13]). Finden sich weniger als 10% vitale Tumoranteile, spricht man von einem guten Ansprechen auf die Therapie, was wiederum mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 73% assoziiert ist. Ein schlechtes Ansprechen (>10% vitaler Tumor) hingegen ist mit einer deutlich niedrigeren 10-Jahres-Überlebensrate von 47% vergesellschaftet. Problematisch bleibt, dass mit Hilfe des „tumor mappings“ eine prognostische Einschätzung der Patienten

erst nach erfolgter neoadjuvanter Chemotherapie und Resektion möglich ist und entsprechend eine signifikante Anzahl Patienten eine Therapie erhält, auf die sie nicht optimal anspricht (Verhältnis gutes zu schlechtes Ansprechen ca. 1:1 [4]). Es darf allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die Chemotherapie immer noch eine bessere Prognose haben als Patienten, die gar keine neoadjuvante Therapie erhalten.

Limitation: Tumorgewebe für Forschung

Neben der Seltenheit von Osteosarkomen leitet sich aus den beschriebenen Behandlungsmodalitäten eine weitere Limitierung für die Verfügbarkeit wissenschaftlich nutzbarer Gewebeproben ab. Da eine Alteration des Tumorgenoms durch die neoadjuvante Chemotherapie nicht ausgeschlossen werden kann, lassen sich für molekulare Analysen nur Anteile der Primärbiopsie verwenden, die nicht zwingend für diagnostische Zwecke benötigt werden. Da weltweit immer weniger offene Biopsien durchgeführt werden und vermehrt Nadelbiopsien mit deutlich geringerem Gewebevolumen zum Einsatz kommen, kann von immer mehr Osteosarkomen kein Frischgewebe zu Forschungszwecken asserviert werden. Die Verwendung von Tumorgewebe aus dem Resektat hätte neben der bereits erfolgten Chemotherapie des Weiteren einen Selektionsbias zur Folge, da Patienten mit

gutem Ansprechen idealerweise keine vitalen Tumoranteile mehr aufweisen und entsprechend unterrepräsentiert wären.

Biomarker

Bis heute gibt es keine etablierten prognostischen oder prädiktiven Biomarker für das Osteosarkom. Zu den am häufigsten alterierten Genen gehören RB1 und TP53. So haben Patienten mit hereditären Retinoblastomen ein erhöhtes Risiko, Osteosarkome zu entwickeln, und auch bei sporadischen Osteosarkomen ist RB1 in bis zu 35% der Fälle inaktiviert [5, 8]. Ähnlich verhält es sich mit TP53, das sowohl im Falle einer Keimbahnmutation (Li-Fraumeni-Syndrom) gehäuft mit Osteosarkomen einhergeht als auch bei sporadischen Tumoren in etwa 40% inaktiviert ist [11, 16]. Der Verlust der Genexpression unterliegt verschiedenen Mechanismen, u. a. Mutationen und Deletionen/Heterozygotitätsverlusten, eine prognostische Relevanz scheint diesen Veränderungen aber nicht zuzukommen [8].

Vor kurzem konnten wir zeigen, dass die Expression des Chemokinliganden CXCL12 und des Zinkfinger-Proteins CRIP1 jeweils mit einer günstigeren Prognose von Osteosarkompatienten assoziiert ist [1, 2]. So haben wir mit Hilfe von „MALDI imaging“ (Matrix-assisted-laser-desorption/ionization-Massenspektrometrie)-Untersuchungen in verschiedenen Karzinomen, aber auch in Osteosarkomen, eine aberrante Expression von CRIP1 („cystein-rich protein 1“) nachge-

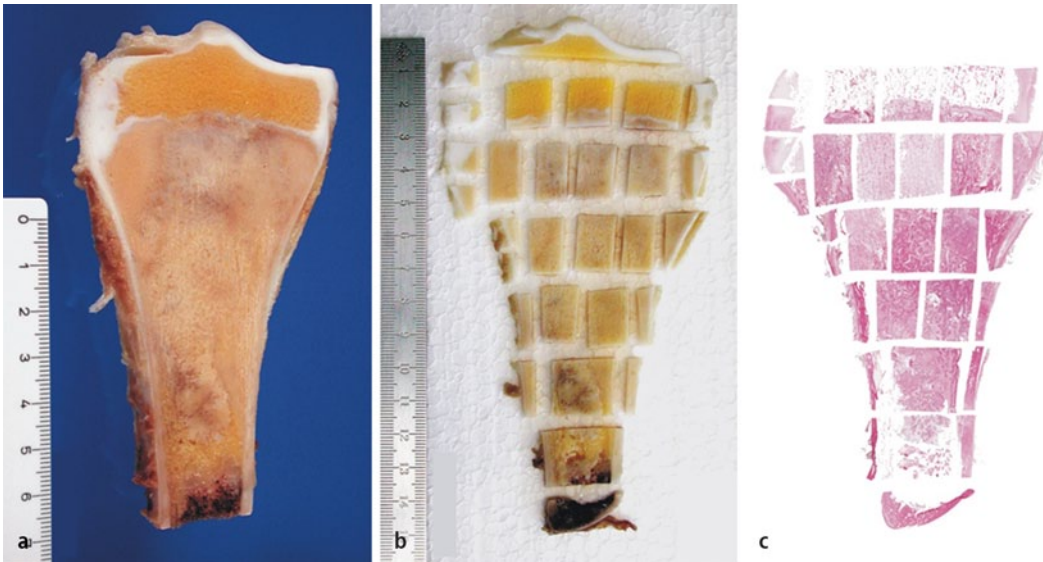


Abb. 1 ◀ Prinzip des „tumor mappings“: Aufsagen des Resektats in Scheiben und Identifizierung des größten Tumordurchmessers (a), Zusägen der Scheibe für die Paraffineinbettung in handelsüblichen Kassetten (b), histologische Aufarbeitung (c)

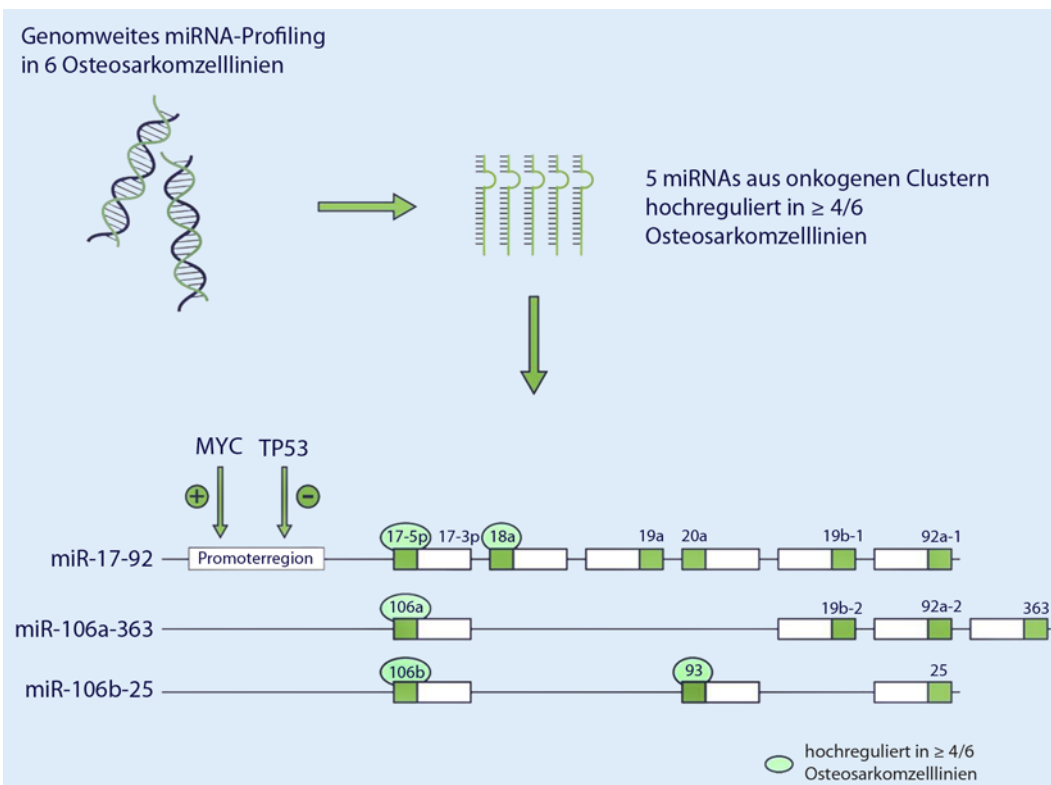


Abb. 2 ◀ Identifizierung von 5 miRNAs aus dem onkogenen Cluster 17-92 und seinen beiden Paraloga in mindestens 4/6 Osteosarkomzelllinien. (Nach [3], mit freundl. Genehmigung des Verlags Elsevier)

wiesen. Tatsächlich zeigte eine Validierung an einem Kollektiv von über 200 prätherapeutischen Osteosarkomproben ein signifikant besseres 10-Jahres-Überleben und eine verminderte Inzidenz manifester Lungenmetastasen in Osteosarkomen mit CRIP1-Expression [1].

Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Untersuchung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie ihres gemeinsamen Liganden CXCL12 beob-

achtet. Eine aberrante Expression dieses Chemokinsignalwegs wurde bereits bei zahlreichen malignen Tumoren beschrieben und überwiegend mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht. In unserem Kollektiv von über 200 Osteosarkomproben zeigte sich ein gegenteiliger Effekt, und die Expression von CXCL12 konnte mit einem signifikant besseren Langzeitüberleben und einer geringeren Inzidenz an Lungenmetastasen

assoziiert werden, möglicherweise über eine rezeptorvermittelte Verankerung der Zellen im Tumor und einer erschwerten Ablösung in die Zirkulation [2]. CRIP1 und CXCL12 sind damit vielversprechende Markerproteine, die für eine Vorhersage der Prognose und prinzipiell auch für eine bessere Therapiestratifizierung von Osteosarkompatienten prospektiv validiert werden sollten.

Das CAS-System

Osteosarkome sind genetisch in der Regel außerordentlich heterogene Tumoren, bei denen verschiedenste numerische und strukturelle Aberrationen auftreten. In einer genomweiten SNP-Chip-Analyse an 45 prätherapeutischen Osteosarkomproben gelang es uns, die Anzahl an Heterozyositätsverlusten („loss of heterozygosity“, LOH) als Maß der genetischen Instabilität mit der Prognose der Patienten zu korrelieren. Des Weiteren konnten wir 4 rekurrierende genetische Aberrationen identifizieren, die alle statistisch signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert waren. Hierzu zählten Amplifikationen von 6p21 (in 15,6% der Fälle), 8q24 (in 15,6% der Fälle, beinhaltet MYC) und 12q14 (in 11,1% der Fälle, beinhaltet CDK4) sowie ein Heterozyositätsverlust von 10q21.1 (in 44,4% der Fälle). Patienten, die mindestens 2 der 4 genetischen Alterationen aufwiesen, hatten eine signifikant schlechtere Prognose als solche, bei denen nur eine oder gar keine der Aberrationen nachgewiesen werden konnte. Tatsächlich erwies sich dieses molekulare Staging (von uns als CAS, „chromosomal alteration staging“, vorgeschlagen) als präziser zur prognostischen Vorhersage als die histologische Regressionsgradbestimmung am Resektat, die wie oben beschrieben als Goldstandard gilt [14].

Chromothripsis

Die bei Osteosarkomen zu beobachtende sehr unterschiedliche Art und Anzahl genetischer Alterationen suggeriert unterschiedliche Entstehungsmechanismen der Tumoren. Erst kürzlich wurde ein neuer Mechanismus beschrieben, bei dem es durch ein singuläres kataklystisches Ereignis zum Zerreißen einzelner oder mehrerer Chromosomen kommt und das als Chromothripsis bezeichnet wurde. Es resultieren neben Verlusten chromosomaler Abschnitte vollständig reorganisierte Chromosomen sowie extrachromosomal amplifizierte Regionen in zufälliger Art und Weise [9]. Tatsächlich konnte dieser Mechanismus auch in Osteosarkomen nachgewiesen werden [15]. Entsprechend einer präliminären eigenen Untersuchung finden sich Chromothripsis-

Pathologe 2013 · [Suppl 2] · 34:260–263 DOI 10.1007/s00292-013-1823-9
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

D. Baumhoer

Molekulare Charakterisierung von Osteosarkomen

Zusammenfassung

Osteosarkome sind seltene Knochentumoren mit einer Inzidenz von etwa 5–6 Fällen/1.000.000 Einwohner/Jahr. Da sich die Prognose der Erkrankung in den letzten 30 Jahren kaum verändert hat und z. Z. immer noch mehr als 30% der Patienten an der Erkrankung versterben, ist ein besseres Verständnis der molekularen Tumorentstehung zur Identifizierung prognostischer und prädiktiver Biomarker sowie potenzieller therapeutischer Targets dringend notwendig. Mit Hilfe genomweiter SNP-Chip-Analysen konnten wir eine genetische Signatur beschreiben, die eine prognostische Prädiktion bereits an der

diagnostischen Biopsie erlaubt. Des Weiteren scheint der MikroRNA-Cluster 17-92 bei Osteosarkomen konstitutiv überexprimiert zu sein. Die hier enthaltenen MikroRNAs sind in ein regulatorisches Netzwerk zahlreicher beim Osteosarkom als dereguliert beschriebener Onkogene und Tumorsuppressor-Gene eingeflochten, sodass es sich hier um einen zentralen Regulator bei der Tumorentstehung handeln könnte.

Schlüsselwörter

Genetische Signatur · Knochentumor · SNP-Chip-Analyse · MikroRNA · miR-17-92-Cluster

Molecular characterization of osteosarcomas

Abstract

Osteosarcomas are rare with an estimated incidence of 5–6 cases per one million inhabitants per year. As the prognosis has not improved significantly over the last 30 years and more than 30% of patients still die of the disease a better understanding of the molecular tumorigenesis is urgently needed to identify prognostic and predictive biomarkers as well as potential therapeutic targets. Using genome-wide SNP chip analyses we were able to detect a genetic signature enabling a prognostic prediction of patients already at the time of initial diagnosis. Furthermore, we

found the microRNA cluster 17-92 to be constitutively overexpressed in osteosarcomas. The microRNAs included here are intermingled in a complex network of several oncogenes and tumor suppressors that have been described to be deregulated in osteosarcomas. Therefore, the microRNA cluster 17-92 could represent a central regulator in the development of osteosarcomas.

Keywords

Genetic signature · Bone tumor · SNP chip analyses · microRNA · miR-17-92 cluster

typische Karyotypen in bis zu 50% bei Osteosarkomen und sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (unveröffentlichte Daten).

Der MikroRNA-Cluster 17-92

MikroRNAs (miRNAs) sind kleine RNA-Moleküle aus 20–25 Nukleotiden, die u. a. als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression dienen und über den so genannten RISC („RNA-induced silencing complex“) zur Degradierung von mRNA-Molekülen führen können [6]. Häufig sind miRNAs in Clustern organisiert, die zusammen als polycistronische Transkripte abgelesen und reguliert werden. Der miR-17-92-Cluster (auch als Oncomir-I bezeichnet) gehörte zusammen mit seinen beiden Paraloga miR-106a-363 und miR-106b-25 zu den ersten

Clustern, bei denen eine onkogene Funktion beschrieben wurde [7]. In der Zwischenzeit wurde für zahlreiche miRNAs aus den beschriebenen Clustern eine Überexpression in verschiedenen malignen Tumoren sowie eine Rolle bei der Beschleunigung des Tumorwachstums, der Stimulation der Neoangiogenese, bei der Apoptosehemmung sowie erst kürzlich bei der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten nachgewiesen [17, 18].

Da wir in einem ersten Screeningansatz potenzielle Veränderungen in der Expression aller bekannter miRNAs (miRBase-Version 15.0, <http://www.mirbase.org>) beim Osteosarkom untersuchen wollten, haben wir uns zur Gewährleistung einer optimalen RNA-Qualität für die Analyse 6 etablierter Osteosarkomzelllinien (HOS58, U2-OS, Saos-2, MNNG/HOS, SJS-1 und MG-63) ent-

schieden und kultivierte humane Osteoblasten (hFOB 1.19) und mesenchymale Stammzellen (L87/4) als Referenzzelllinien verwendet. Die Untersuchung selbst wurde von Exiqon (Vedbaek, Dänemark) mit Hilfe von miRCURY™-LNA-Arrays durchgeführt und zeigte eine auffallende Überexpression von 5 miRNAs aus den beschriebenen Clustern (miR-17-5p, miR-18a, miR-93, miR-106a und miR-106b) in mindestens 4 der 6 eingesetzten Zelllinien im Vergleich zu beiden Referenzen (■ **Abb. 2**; [3]). Die Ergebnisse wurden in der Zwischenzeit von einer unabhängigen Gruppe bestätigt [10].

Interessanterweise sind der miRNA-Cluster 17-92 und seine beiden Paraloga in ein komplexes regulatorisches Netzwerk eingeflochten, das u. a. durch MYC stimuliert und durch TP53 gehemmt wird. Die einzelnen miRNAs wiederum sind neben zahlreichen anderen Genen an der Regulation von FAS und RB1 beteiligt, sodass sich zusammen mit deren kürzlich beschriebener Rolle in der Osteoblastendifferenzierung ein pathogenetisch relevanter Regelkreis abzeichnet, dessen weitere Untersuchung auch bzgl. der genauen funktionellen Zusammenhänge vielversprechend erscheint.

Schlussfolgerung

Die Wirksamkeit aktueller Therapieprotokolle bei Osteosarkompatienten variiert erheblich und für einen Teil der Patienten stehen z. Z. noch keine wirksamen und kurativen Alternativen zur Verfügung. Zusammen mit den außerordentlich divergenten Karyotypen gibt es daher zahlreiche Argumente dafür, dass es sich beim Osteosarkom nicht um ein einheitliches Krankheitsbild handelt. Die diskutierten Biomarker (CRIP und CXCL12), das CAS-System sowie die genauere Untersuchung von Chromothripsis und der Rolle des miR-17-92-Clusters sind vielversprechende Ansätze, die auf eine personalisierte Stratifizierung von Patienten mit individueller Einschätzung und Prädiktion von Prognose und Therapie hinzielen. Möglicherweise können in diesem Zusammenhang auch neue therapeutische Targets identifiziert und innovative Therapieoptionen ermöglicht werden.

Fazit für die Praxis

- Die Asservierung prätherapeutischer Frischgewebeproben (+Normalgewebe) ist essenziell für die Durchführung molekularer Analysen und sollte wenn immer möglich durchgeführt werden.
- Eine klinikübergreifende Kollaboration ist eine zwingende Voraussetzung für die weitere Erforschung der sehr seltenen Osteosarkome.
- Bislang gibt es keine etablierten prognostischen oder prädiktiven Biomarker beim Osteosarkom; die hier dargestellten Ergebnisse müssen zunächst an unabhängigen Kollektiven validiert werden.

Korrespondenzadresse

PD Dr. D. Baumhoer

Knochtumor-Referenzzentrum
am Institut für Pathologie,
Universitätsspital Basel
Schönbeinstr. 40, 4031 Basel
Schweiz
daniel.baumhoer@usb.ch

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. D. Baumhoer gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

The supplement this article is part of is not sponsored by the industry.

Literatur

1. Baumhoer D, Elsner M, Smida J et al (2011) CRIP1 expression is correlated with a favorable outcome and less metastases in osteosarcoma patients. *Oncotarget* 2:970–975
2. Baumhoer D, Smida J, Zillmer S et al (2012) Strong expression of CXCL12 is associated with a favorable outcome in osteosarcoma. *Mod Pathol* 25:522–528
3. Baumhoer D, Zillmer S, Unger K et al (2012) MicroRNA profiling with correlation to gene expression revealed the oncogenic miR-17-92 cluster to be up-regulated in osteosarcoma. *Cancer Genet* 205:212–219
4. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G et al (2002) Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 20:776–790

5. Draper GJ, Sanders BM, Kingston JE (1986) Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 53:661–671
6. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102–114
7. He L, Thomson JM, Hemann MT et al (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435:828–833
8. Heinsohn S, Evermann U, Zur Stadt U et al (2007) Determination of the prognostic value of loss of heterozygosity at the retinoblastoma gene in osteosarcoma. *Int J Oncol* 30:1205–1214
9. Holland AJ, Cleveland DW (2012) Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 18:1630–1638
10. Namlos HM, Meza-Zepeda LA, Baroy T et al (2012) Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs. *PLoS One* 7:e48086
11. Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL et al (2012) Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer* 118:1387–1396
12. Rosenberg AE, Cleton-Jansen A-M, De Pinieux G et al (2013) Conventional osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F (Hrsg) WHO classification of tumours of tumours of soft tissue and bone. IARC Press, Lyon, S 282–288
13. Salzer-Kuntschik M, Delling G, Beron G et al (1983) Morphological grades of regression in osteosarcoma after polychemotherapy – study COSS80. *J Cancer Res Clin Oncol* 106(Suppl):21–24
14. Smida J, Baumhoer D, Rosemann M et al (2010) Genomic alterations and allelic imbalances are strong prognostic predictors in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 16:4256–4267
15. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B et al (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144:27–40
16. Tsuchiya T, Sekine K, Hinohara S et al (2000) Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 120:91–98
17. Xiang J, Wu J (2010) Feud or friend? The role of the miR-17-92 cluster in tumorigenesis. *Curr Genomics* 11:129–135
18. Zhou M, Ma J, Chen S et al (2013) MicroRNA-17-92 cluster regulates osteoblast proliferation and differentiation. *Endocrine* [Epub ahead of print]