FACHÜBERGREIFEND 01.11.2015

Tumor-spezifische Exosome



Hochsensitive Diagnostikmarker für die Früherkennung von gastrointestinalen Karzinomen

Bei Exosomen handelt es sich um Membranbläschen in der Größe von Viren (50 bis 150 Nanometer) [1]. Sie werden sowohl von Tumorzellen als auch von vielen anderen Zelltypen (Immunzellen, Bindegewebszellen, Thrombozyten) milliardenfach gebildet und in die Blutbahn abgegeben. Dabei transportieren sie Fragmente von Desoxyribonukleinsäuren (DNA), Ribonukleinsäuren (RNA) und Eiweißen (Proteinen), welche spezifisch für ihre Ursprungszellen sind [1–3]. Durch den exosomalen Transfer von Proteinen und Nukleinsäuren können Zellen miteinander kommunizieren. Somit spielen Exosome bei der interzellulären Signalkaskade bei physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle [1]. Exosome kommen sowohl bei Gesunden als auch bei Menschen mit einer Erkrankung in vielen unterschiedlichen Körperflüssigkeiten vor. Dazu zählen Serum/Plasma [3], Urin [4], Aszites [5] und Speichel [6]. Aufgrund der doppelwandigen Lipidschicht sind Exosome sehr stabil und lagerungsbeständig. Bei einer Kühltemperatur von 4°C können sie bis zu 96 Stunden unbeschadet aufbewahrt werden. Bei einer Lagerung von -80°C können sie über mehrere Jahre konserviert werden [7]. Diese Eigenschaften qualifizieren Exosome als nicht- oder minimal-invasive Biomarker zur Diagnose und Verlaufskontrolle bei Karzinomerkrankungen oder anderen chronischen Erkrankungen des Gastro-Intestinaltraktes.

Exosome in der Tumorbiologie

Die Biogenese der Exosome findet intrazellulär in den Endosomen statt. Bei diesem Prozess werden Micro- und mRNA-Moleküle, Proteine und DNA-Fragmente in die Exosome aufgenommen. Anschließend werden die Exosome in einem multivesikulären Endosom an die Zellmembran transportiert und in das extrazelluläre Interstitium bzw. in die Blutgefäße sezerniert. Hier können die Exosome von anderen Zellen aufgenommen werden. Dabei wird ihr Inhalt an Nukleinsäuren und Proteinen ebenfalls in die Empfängerzelle transferiert. So können Tumorzellen mittels Exosomen onkogene Eigenschaften auf andere Zellen übertragen.

Demory-Beckler und Kollegen bewiesen durch ihre Studie, dass mittels Exosomen mutiertes KRAS-Protein übertragen werden kann. Dies führte in den Empfängerzellen ohne Mutation zu einer deutlich gesteigerten Proliferation [8]. Melo et al. inkubierten nicht-tumorgene, epitheliale Brustzellen mit Exosomen aus einer Mammakarzinom-Zelllinie. Dadurch bildeten die behandelten Brustzellen Tumore aus. Bei der unbehandelten Kontrollgruppe hingegen zeigte sich kein Tumorwachstum [2]. Auch bei der Formation einer prä-metastatischen Nische spielen Tumor-Exosome eine wichtige Rolle. Dass Exosomen von Melanomzellen den c-MET Rezeptor auf Knochenmarkstammzellen übertragen, konnten Peinado und Kollegen in ihrer Studie zeigen. Dadurch kommt es zu einer Mobilisierung und Ausschwemmung dieser Knochenmarkzellen in die Lunge. Hier verändern die Knochenmarkzellen das lokale, zelluläre Mikromilieu. Das Resultat ist eine gesteigerte Anzahl von pulmonalen Melanommetastasen [9].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Exosome von Pankreaskarzinomzellen durch Makrophagen in der Leber aufgenommen werden. Dadurch kommt es zu einer Sekretion von TGF-β in den Makrophagen. Dieses wiederum führt zu einer vermehrten Ablagerung von Fibronectin in die Leber, welches die hepatische Metastasierung begünstigt [10]. Exosome spielen durch den interzellulären Transport und Transfer von Nukleinsäuren und Proteinen bei der Tumorprogression und -dissemination eine wichtige Rolle, lässt sich zusammenfassend feststellen. Die Identifizierung und Charakterisierung tumorspezifischer Exosome kann man sich insofern zunutze machen, indem sie als nicht-invasive Biomarker aus dem Serum und anderer Körperflüssigkeiten verwendet werden.

Diagnostischer und therapeutischer Stellenwert von Tumorexosomen

Exosome lassen sich in nahezu allen Körperflüssigkeiten nachweisen. Sie sind sehr stabil und es sind nur wenige Tropfen Blut erforderlich, um ihren Gehalt und ihr molekularbiologisches Profil im Serum zu messen. Dieses ist ein deutlicher Vorteil gegenüber anderen Tumormarkern wie zum Beispiel zirkulierenden Krebszellen. Deren Nachweis ist sehr schwierig und es muss deutlich mehr Blut vom Spender entnommen werden. Diese Eigenschaften sind eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von tumor-spezifischen Exosomen als nicht-invasive Biomarker [1].

Für Exosome sind verschiedene extra- und intrazelluläre Proteine charakteristisch, welche unabhängig vom zellulären Ursprung sind. Darüber hinaus sind tumor-spezifische Exosome im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten durch weitere Oberflächenproteine gekennzeichnet, die sie von nicht-tumorgenen Exosomen unterscheidet. So findet man z. B. im Serum von Patienten mit einem Ovarialkarzinom eine Zunahme von EpCAM-positiven Exosomen. Im Serum von Patienten mit Magen- oder Brustkrebs sind vermehrt Exosome nachweisbar, welche Membranproteine der „Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)“-Familie tragen [11]. Exosome von Pankreaskarzinomen sind durch eine Überexpression von EGFR und EpCAM gekennzeichnet [12, 13]. Des Weiteren können Exosome auch zur nicht-invasiven Erschließung des Mutationsstatus des Primärtumors verwendet werden. Skog et al. konnten zeigen, dass auf Exosomen aus dem Serum von Patienten mit einem Glioblastom der gleiche mutierte EGFR-Rezeptor zu finden ist wie auf dem Primärtumor [14]. Da der Rezeptorstatus bei der Therapie von großer Bedeutung ist, könnte mit dieser sehr minimal-invasiven Technik auf eine hochinvasive Kraniotomie zur Probenbestimmung zukünftig verzichtet werden.

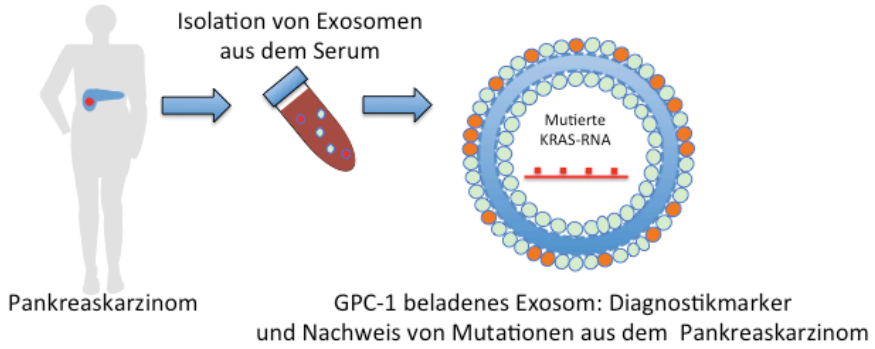
Durch ihre Oberflächenmarker können tumor-spezifische Exosome aus dem Serum identifiziert und als hochsensitive und hochspezifische Diagnostikmarker verwendet werden. In einer Studie untersuchten Madhavan und Kollegen ein Panel von Proteinen und microRNAs in Exosomen von Patienten mit einem Pankreaskarzinom [13]. Hierbei konnten sie mit einer hohen Sensitivität (1.00, 95 % CI: 0.95-1) und einer guten Spezifität (0.80, 95 % CI: 0.67-0.90) zwischen Tumorpatienten und Gesunden unterscheiden. Auch bei Patienten mit einem Ösophaguskarzinom könnte die Analyse von exosomalen microRNAs eine wichtige diagnostische Rolle spielen. Karen Chiam und Kollegen konnten mit Hilfe eines Multi-Biomarker Panels, bestehend aus zehn exosomalen microRNAs, mit nahezu perfekter Sensitivität und Spezifität zwischen Patienten mit einem Ösophaguskarzinom und gesunden Spendern bzw. Patienten mit einem nicht-dysplastischen Barrett-Ösophagus unterscheiden (Area under the curve: 0.99, 95 %-CI: 0,96 – 1,00) [15]. Ähnlich vielversprechende Ergebnisse konnten Gummireddy und seine Kollegen in ihrer Studie an Patienten mit einem Lungenkarzinom demonstrieren. Durch die Bestimmung des exosomalen mRNA-Transkripts AKAP4 aus dem Serum gelang es ihnen mit einer Sensitivität von 92,8 % und einer Spezifizität von 100 % zwischen Patienten mit einem Malignom und Patienten mit einer gutartigen Lungenerkrankung zu differenzieren [16]. Allerdings sind diese Tests sehr komplex und aufgrund der Kombination von mehreren Proteinen bzw. von multiplen (micro-) RNAs sehr fehleranfällig.

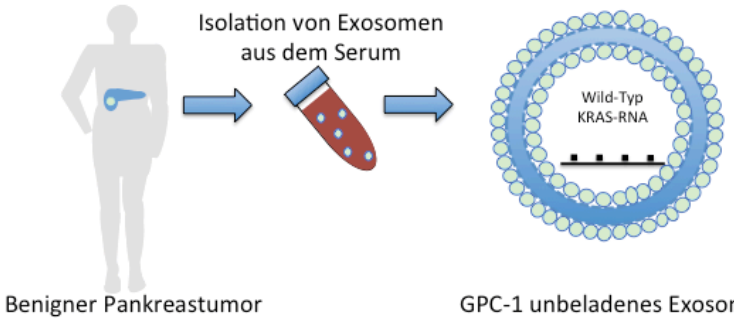
GPC-1 positive Exosome sind hochsensitive Serummarker zur nicht-invasiven Diagnose von Pankreasfrühkarzinomen

In einer unserer Studien konnten wir erstmalig nachweisen, dass Exosome Fragmente von doppel-strängiger, genomischer DNA enthalten. Diese DNA ist bis auf das Vorhandensein von mitochondrialer DNA identisch mit den Ursprungszellen. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass sich durch Sequenzierung von exosomaler DNA aus dem Serum von Patienten mit einem Pankreaskarzinom KRAS und p53 Mutationen nachweisen lassen [3]. Allerdings hatte die in unserer ersten Studie beschriebene Methode den Nachteil, dass Exosome nur sehr unspezifisch aus dem Blut angereichert wurden. Durch die Gewinnung von Exosomen mittels Ultrazentrifugation wurden neben tumorgenen Exosomen auch Exosome von nicht-tumorgenen Zellen wie Immunzellen oder Thrombozyten angereichert. Diese Problematik versuchten wir in unserer Folgestudie zu lösen [17]. Dazu erforschten wir, ob es tumor-spezifische Oberflächenmarker gibt, mit deren Hilfe man gezielt tumor-spezifische Exosome aus dem Serum von Patienten mit einer Malignomerkrankung anreichern kann. Hierbei konnte von uns nachgewiesen werden, dass das Glykoprotein Glypcian-1 (GPC-1) insbesondere auf Tumorexosomen von Pankreaskarzinomen angereichert wird. In zwei unabhängigen Kohorten mit ca. 250 Patienten mit einem Pankreaskarzinom und 140 Kontrollspendern konnte gezeigt werden, dass GPC-1-positive Exosome mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 % zwischen tumorbefallenen Patienten und Gesunden bzw. Patienten mit einer nicht-malignen Pankreaserkrankung (chronische Pankreatitis und benigne Zystadenome) diskriminieren können (**Abb. 1**).

Dieses gilt bereits für Patienten mit einem carcinoma-in-situ (pTis) oder Patienten in einem sehr frühen Tumorstadium (UICC I). Zudem konnten wir zeigen, dass sich GPC-1 positive Exosome möglicherweise als hochsensitive Verlaufsmarker eignen. Bereits sieben Tage nach Tumorresektion eines Pankreaskarzinoms zeigten 29 von 30 Patienten einen signifikanten Abfall Glypican-1 positiver Exosome im Blut. In der gleichen Kohorte zeigte sich der Tumorstandard-Marker CA 19-9 nur bei 19 von 30 Patienten rückläufig. Zudem ergab die univariate und multivariate Überlebensanalyse, dass Patienten mit einem starken Abfall von GPC-1 positiven Exosomen ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufwiesen. Somit eignen sich GPC-1 positive Exosome möglicherweise auch als nicht-invasive Prognosemarker. Sie könnten z. B. bei der Risikostratifizierung von Patienten eingesetzt werden um eine personalisierte Heilbehandlung anzubieten. Schließlich konnten wir in unserer Studie nachweisen, dass sich durch das Oberflächenprotein GPC-1 tumor-spezifische Exosome anreichern lassen. Diese können durch ein spezielles Verfahren (FACS-sorting) so aufgereinigt werden, dass sie für weitere molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden können. So haben wir z. B. in unserer aktuellen Studie gezeigt, dass sich aus GPC-1 positiven Exosomen RNA isolieren lässt, die Rückschlüsse über den KRAS-Mutationsstatus des Primärtumores erlaubt (**Abb. 1**).

Abb. 1: Schematische Darstellung für den möglichen Einsatz GPC-1 positiver Exosome. Bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom (obere Reihe) lassen sich im Serum GPC-1 positive Exosome nachweisen. Diese können für weitere molekularbiologische Analysen verwendet werden um z. B. den Mutationsstatus des Primärkarzinoms über einen nicht-invasiven Bluttest zu bestimmen. Patienten mit einer gutartigen Pankreaserkrankung (untere Reihe) haben keine GPC-1 positiven Exosome im Blut. Sie würden zunächst kein weiteres onkologisches Prozedere benötigen.





Fazit

Sowohl wir als auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich durch die molekularbiologische Charakterisierung von Exosomen die diagnostische Präzision von nicht-invasiven Serum-Tumormarkern deutlich verbessern lässt. Insbesondere das Glykoprotein GPC-1 scheint bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom hochspezifisch und hochsensitiv zu sein. Zukünftig könnten daher GPC-1 beladene Exosome bei der Früherkennung von Pankreaskarzinomen eine Rolle spielen. Sollten unsere Ergebnisse in weiteren, multizentrischen Studien unter Einschluss von prospektiven Kohorten bestätigt werden, könnten GPC-1 positive Exosome zu einer Verbesserung der Prognose von Bauchspeicheldrüsenkrebs führen. Je früher Pankreaskarzinome oder deren Vorstufen erkannt werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der gesamte Tumor durch eine Operation entfernt werden kann. Dadurch lassen sich die Chancen auf eine Heilung deutlich verbessern bei einer Erkrankung, an der gegenwärtig 95 % aller Patienten innerhalb von fünf Jahren nach Erstdiagnose versterben.

Literatur

[1] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. J Mol Med (Berl) 2013;91:431-7.

[2] Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. Cancer Cell 2014;26:707-21.

[3] Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. J Biol Chem 2014;289:3869-75.

[4] Dijkstra S, Birker IL, Smit FP, et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. J Urol 2014;191:1132-8.

[5] Im H, Shao H, Park YI, et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. Nat Biotechnol 2014;32:490-5.

[6] Lau C, Kim Y, Chia D, et al. Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development. J Biol Chem 2013;288:26888-97.

[7] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecol Oncol 2008;110:13-21.

[8] Demory Beckler M, Higginbotham JN, Franklin JL, et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. Mol Cell Proteomics 2013;12:343-55.

[9] Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. Nat Med 2012;18:883-91.

[10] Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. Nat Cell Biol 2015;17:816-26.

[11] Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, et al. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2010;59:841-50.

[12] Adamczyk KA, Klein-Scory S, Tehrani MM, et al. Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. Life Sci 2011;89:304-12.

[13] Madhavan B, Yue S, Galli U, et al. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. Int J Cancer 2015;136:2616-27.

[14] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol 2008;10:1470-6.

[15] Chiam K, Wang T, Watson DI, et al. Circulating Serum Exosomal miRNAs As Potential Biomarkers for Esophageal Adenocarcinoma. J Gastrointest Surg 2015;19:1208-15.

[16] Gumireddy K, Li A, Chang DH, et al. AKAP4 is a circulating biomarker for non-small cell lung cancer. Oncotarget 2015;6:17637-47.

[17] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. Nature 2015;523:177-82.

Kahlert C./Rahbari N./Reißfelder C./Weitz J. Tumor-spezifische Exosome: hochsensitive Diagnostikmarker für die Früherkennung von gastrointestinalen Karzinomen 2015 November, 5(11): Artikel 02_05.