



Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

Neue Biomarker für die Laboratoriumsmedizin

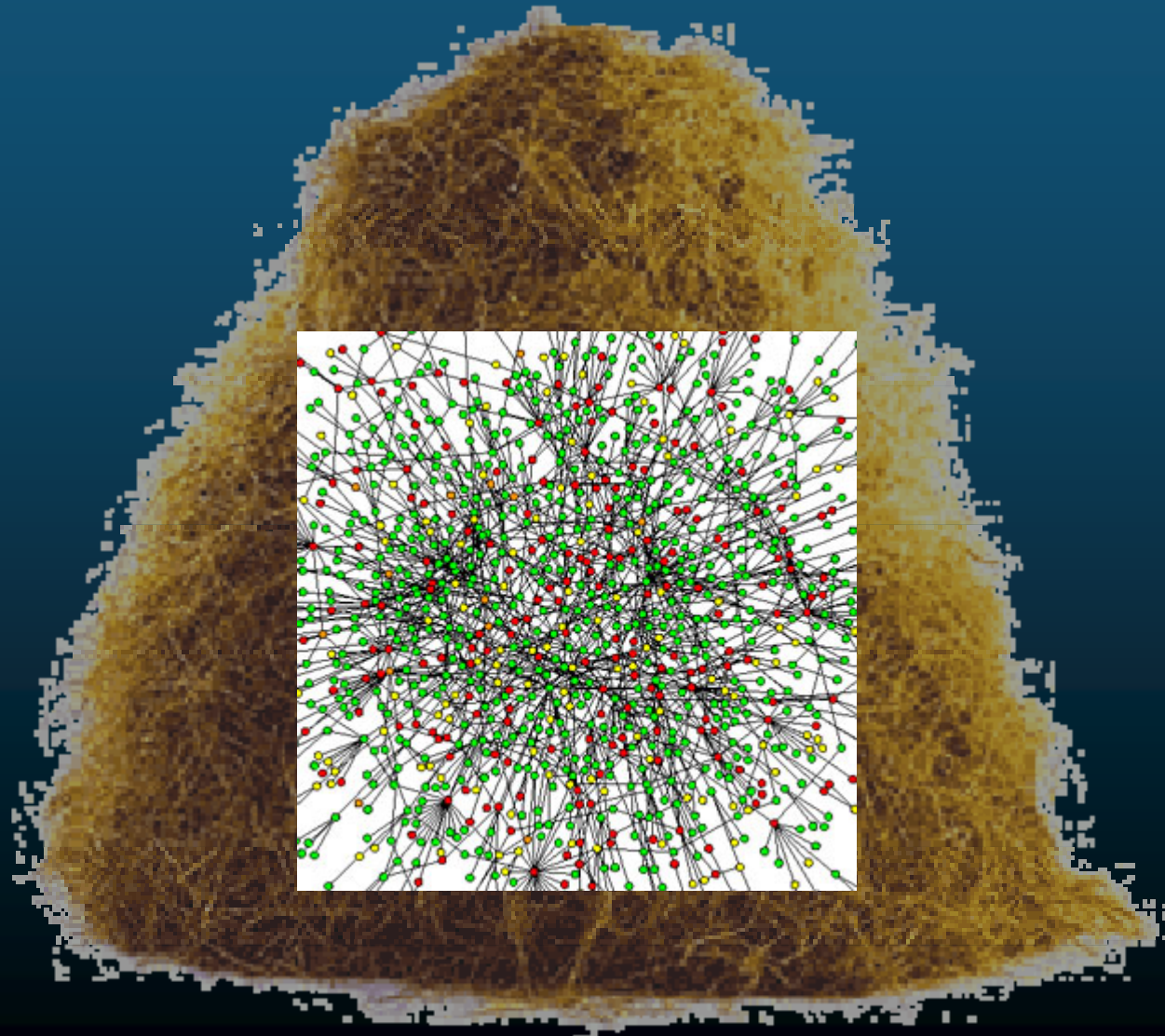
Joachim Thiery

Instand- Symposium
Berlin 03. Juli 2009

Warum gibt es nur wenige validierte Biomarker?

- **komplexe Pathogenese der Erkrankungen**
- **Variabilität der Krankheitsphänotypen**
- **individuelle genetische Disposition**
- **Einfluß Lebensstil und Umweltfaktoren**

Biomarker für die Laboratoriumsmedizin ?



Neue Biomarker für die Laboratoriumsmedizin

1. Prozess der Biomarkervalidierung
2. Non-target Proteom-Analytik
3. Genomweite Analytik
4. Ausblick: Identifizierung neuer Zielmoleküle für Zivilisationskrankheiten (Landesexzellenzinitiative LIFE)

Definition eines Biomarkers

„Biomarker sind messbare biochemische oder molekulare Größen, die einen physiologischen oder pathologischen Prozess oder die Antwort auf eine therapeutische Intervention beschreiben“

Was erwarten wir von Biomarkern?

Labormedizinische Biomarker dienen dazu,

- das individuelle Risiko einer Erkrankung abzuschätzen
- eine bestehende Erkrankung zu diagnostizieren
- den Schweregrad einer Erkrankung zu charakterisieren
- einen Therapieeffekt im Organismus zu quantifizieren
- die Sicherheit einer Therapie zu beurteilen und
- die Patientengruppen zu identifizieren, die nicht von einer Therapie profitieren

Therapeutische Option

Labormedizinische Biomarker können
als therapeutische Zielmoleküle dienen

Postulate für Kausalität

- **Kohärenz der Effekte in vitro, im Tiermodell und beim Menschen**
- **Konsistenz der Effekte in klinischen Studien**
- **Sensitivität und Spezifität für einen Krankheitsprozess**
- **Dosis-Wirkungs-Beziehung**
- **Unabhängigkeit von etablierten Risikofaktoren**
- **Präzise und reproduzierbare labormedizinische Analytik**

Limitierung von Biomarkern

Der Nachweis der Assoziation eines Biomarkers mit einer Erkrankung in epidemiologischen Beobachtungsstudien reicht nicht aus, um eine kausale Beziehung zu postulieren.

Der Beweis eines kausalen Zusammenhangs ist erst durch Interventionsstudien möglich.

Phasen der Biomarker-Entwicklung

Discovery-Phase

Qualification

Verification

Assay Development

Rifai et al., Nat Biotechnol. 2006, 24(8):971-83

Phasen der Biomarker-Entwicklung

Discovery-Phase

Identifikation von Biomarker-Kandidaten (Proteine)

- non-target-Ansatz / hypothesenfrei
- hochstandardisierte Proben mit mutmaßlich hoher Biomarkerkonzentration
(Zellkultur, Gewebe, Tiermodell, „gold-standard“-Humanproben)
- Depletion abundanter Proteine
- extensive Fraktionierung
- semiquantitative Analytik
- explorative Statistik und Datenanalyse

Phasen der Biomarker-Entwicklung

Qualification-Phase

Differentieller Nachweis in Patientenproben

- Targeted-Ansatz
- hochstandardisierte Proben (mit reduzierter biologischer Variation) von exzellent phänotypisierten Patienten
- Depletion und Fraktionierung
- quantitativer Nachweis
- multivariate Datenanalyse, komparative Statistik

Phasen der Biomarker-Entwicklung

Verification-Phase

Leistungsdatenerhebung der Kandidaten

- Targeted-Ansatz
- Populationsbasierte Proben, normale biologische Variation
- Fraktionierung und ggf. selektive Anreicherung
- quantitativer Nachweis
- multivariate Datenanalyse, Leistungsdaten
(Sensitivität, Spezifität, AUROC-Analysen)

Phasen der Biomarker-Entwicklung

Assay-Phase

Leistungsdatenerhebung der Kandidaten

- Targeted-Ansatz
- Populations und krankheitsbezogene Variation
- Assay-Entwicklung (Multiplex-Option)
- High-Throughput –Analytik in großen Kollektiven
- Klinische Bewertung von Sensitivität, Spezifität, ppV, prospektive Evaluation zur Kausalität

Identifizierung und Validierung von Biomarkern

Identifizierung

Gezielte
Verifizierung

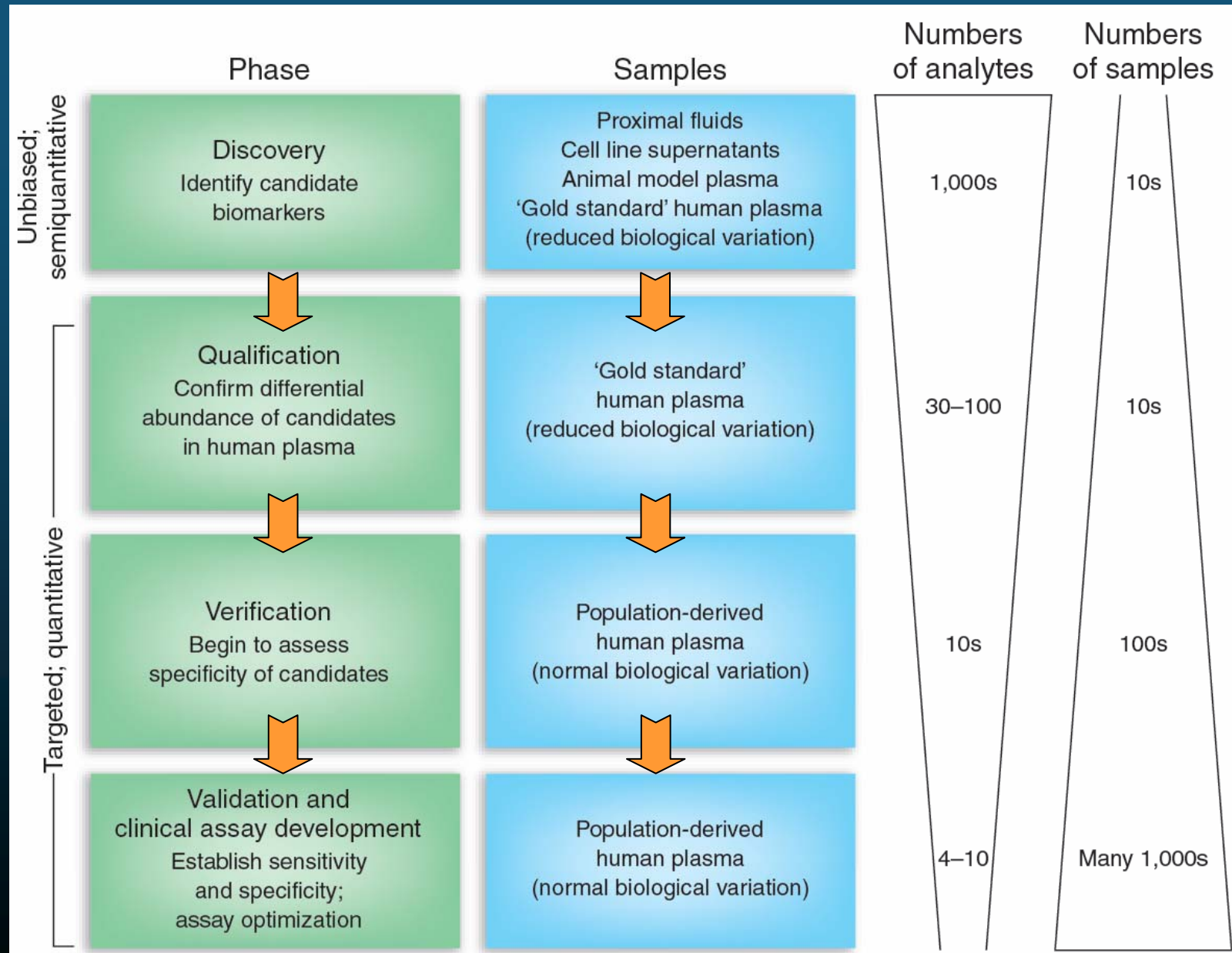
Quantifizieren

Replikation

Spezifität
Spezifität

Klinische
Validierung

*Rifai et al.,
Nature 2006*



Neue Biomarker für die Laboratoriumsmedizin

1. Prozess der Biomarkervalidierung
2. Non-target Proteom-Analytik
3. Genomweite Analytik
4. Ausblick: Identifizierung neuer Zielmoleküle für Zivilisationskrankheiten (Landesexzellenzinitiative LIFE)

The ‚false positives‘ problem

	Preliminary set (n=100)	Masked set (n=116)
Unaffected women		
No evidence of ovarian cysts	37	24
Benign ovarian cysts <2.5 cm	11	19
Benign ovarian cysts >2.5 cm	2	6
Benign gynaecological disease*	0	10
Non-gynaecological inflammatory disorder*	0	7
Women with ovarian cancer		
Stage I	6	18
Stage II, III, IV	44	32

*Individuals recruited from general population. All others were from a high-risk clinic.

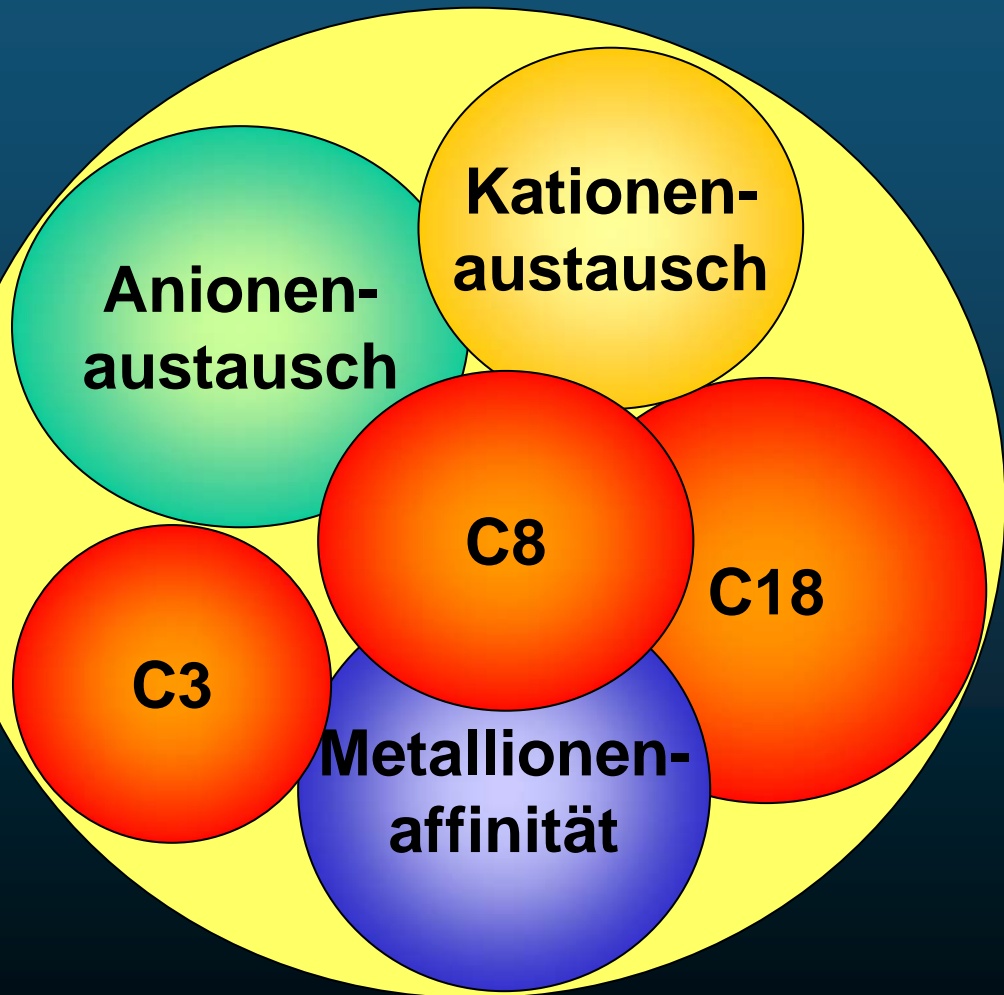
Table 1: **Disease status of preliminary and masked sets**

Petricoin III EF, Lancet 359; 572-7, 2002

„Distillation of true positives from the total pool of candidates is the single greatest challenge in biomarker development.“

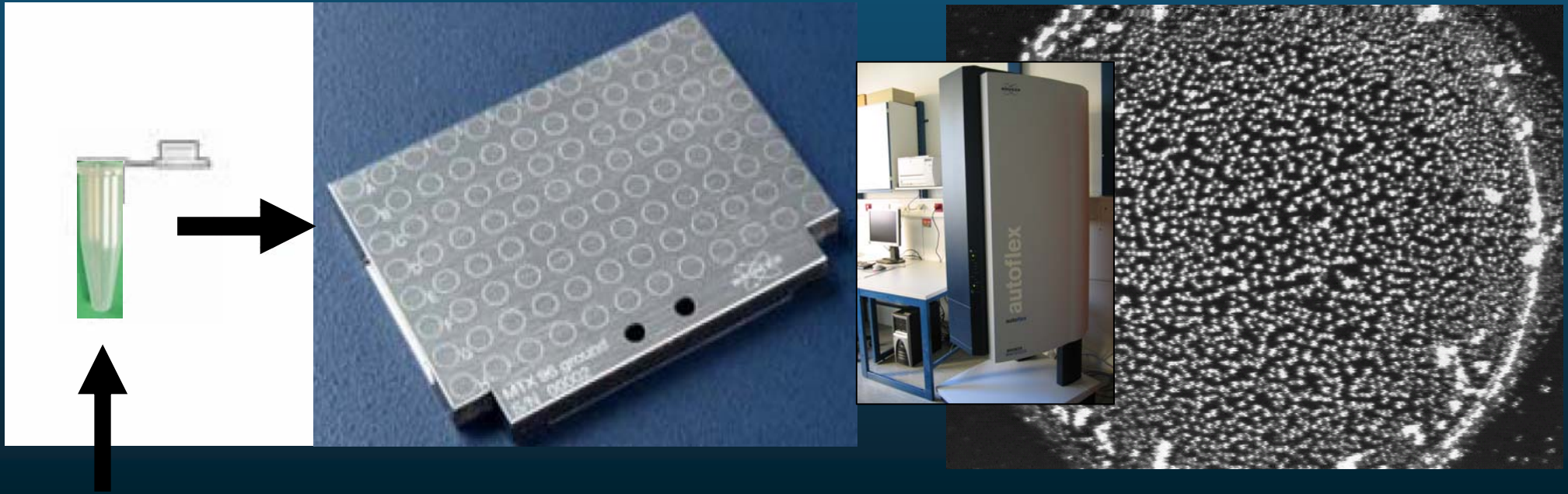
Rifai et al., Nat Biotechnol. 2006, 24(8):971-83.

Peptid/Protein Fraktionierung und Isolierung mit Hilfe magnetischer Mikropartikel



- Mikropartikel mit Magnetkern
- Polymerhülle
- auf der Oberfläche immobilisiert funktionelle Gruppen
- - selektive Anreicherung von Peptiden/Proteinen
- Matrixabtrennung

Targetpräparation

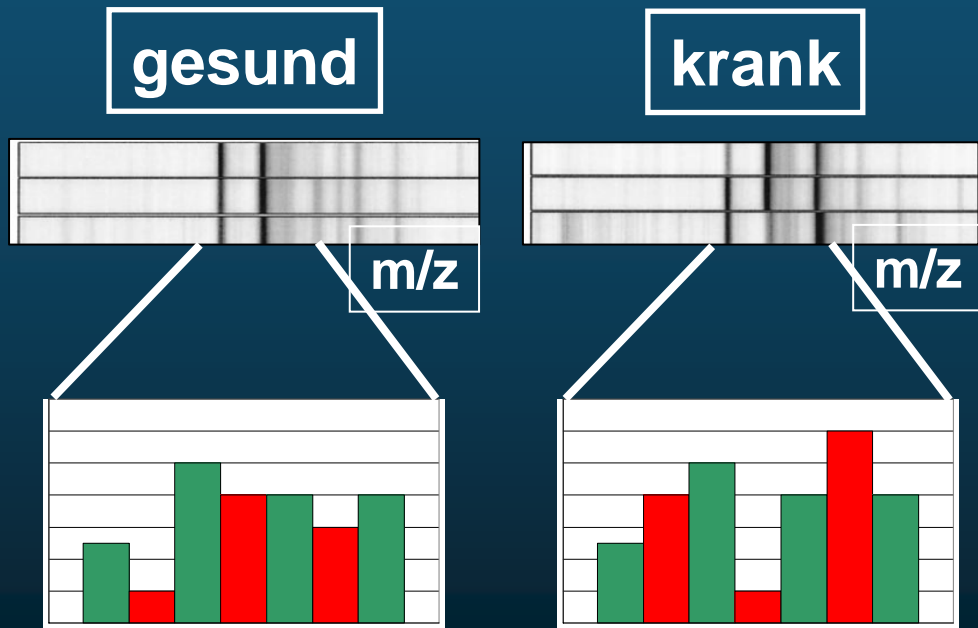


Analyt (Peptide/Proteine)
+ **Matrix** (2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB))

**Kokristallisation von
Matrix und Analyt**

Prinzip der Proteom-Analyse

„Training“



„fingerprint pattern“, welches mit hoher Sensitivität und Spezifität zwischen gesund und krank differenziert

Klinische Evaluierung

Unbekannte Probe

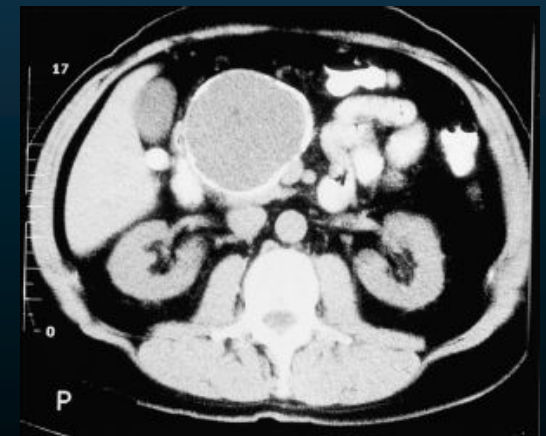
diagnostischer „fingerprint“

gesund

krank

Beispiel: Pankreaskarzinom

- Inzidenz ca. 13.000 / Jahr in Deutschland
- 5-Jahres-Überlebensrate ~5%
- Tumormarker (CA19-9)
- Therapeutische Voraussetzung: Früherkennung!!!



From the haystack to the needle

signals (n=3000 / 2400)

p-value ($p < 0.05$) dependent peak selection (n=600 / 57)

cross-testing (entanglement) (n=7 / 4)

rectification testing of candidates (n=4)

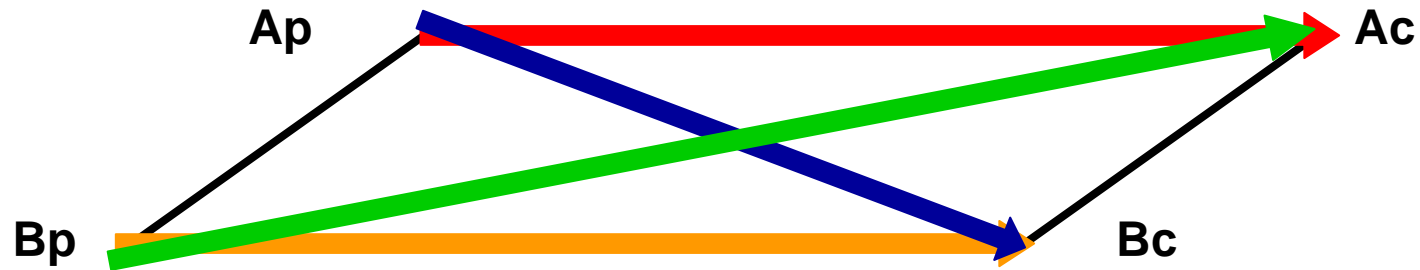
testing of selectivity (n=4)

candidate peptides LE 25, LE 68 (n=2)



ClinProTools™
Proteomics.net

Study design: Cross-testing strategy (entangled peak selection and external confirmation)



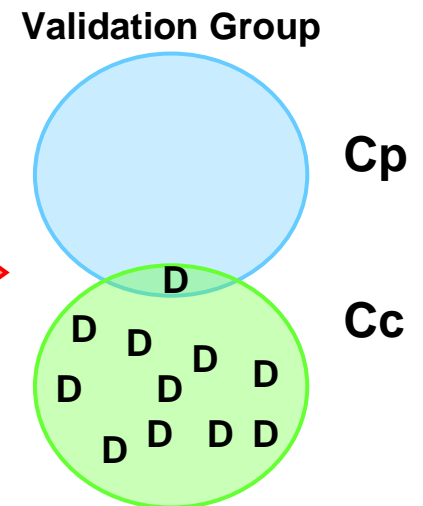
1.	A
2.	B
3.	C
4.	D
5.	E
6.	F

1.	X
2.	Y
3.	C
4.	D
5.	E
6.	H

1.	Z
2.	B
3.	C
4.	D
5.	E
6.	H

1.	A
2.	Y
3.	N
4.	D
5.	L
6.	H

Discriminator D



Ap/Ac

Bp/Bc

Ap/Bc

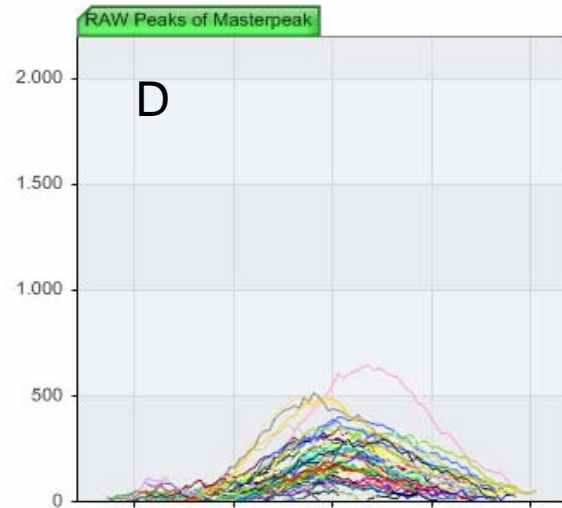
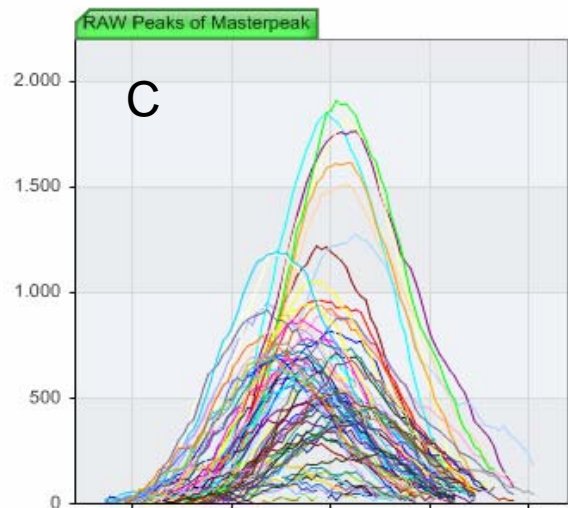
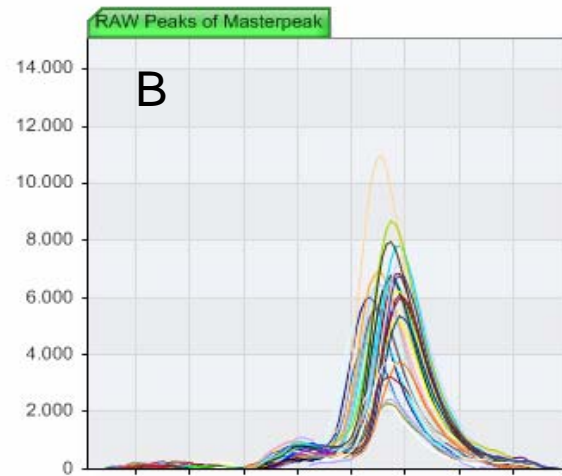
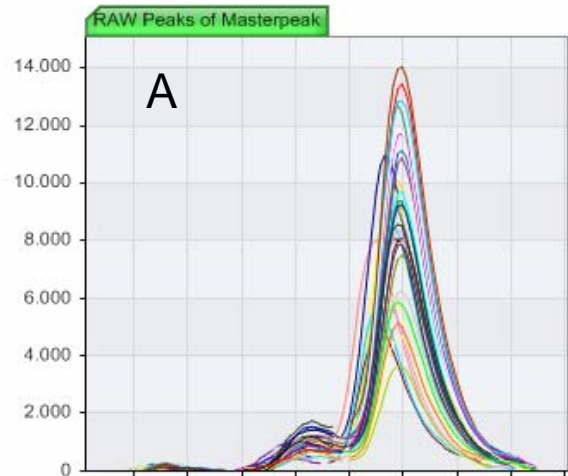
Bp/Ac

Selection of discriminating peaks in all comparisons

Filtering of common peaks

Application of candidate peaks on external validation set

Discriminating peaks

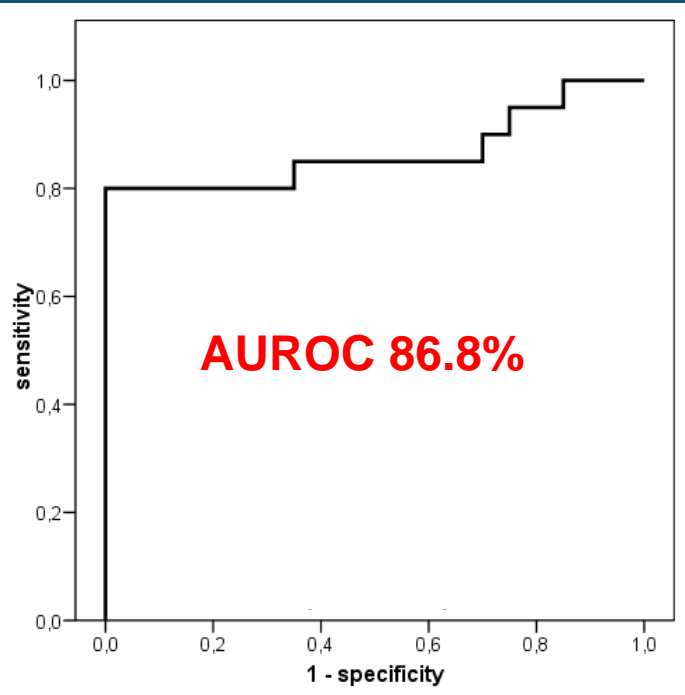


Peak m/z 3884:
Platelet Factor 4 (PF4),
double charged ion

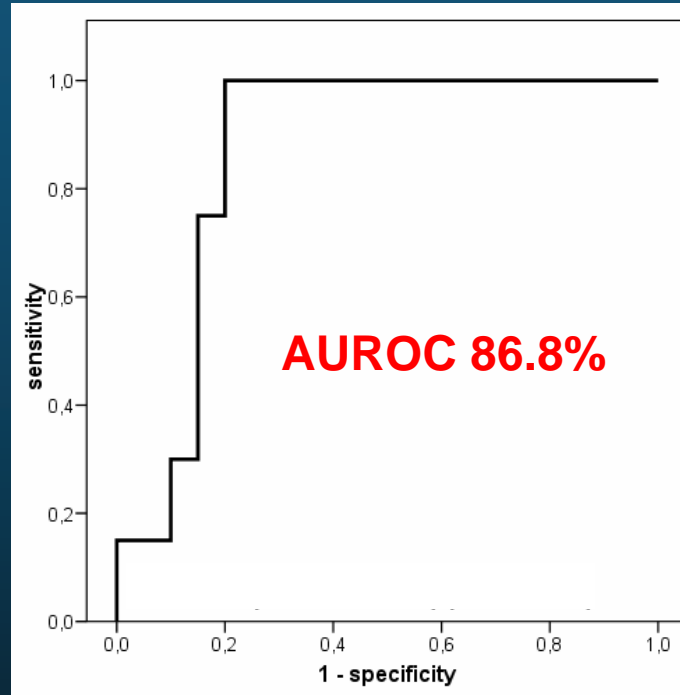
A & C Controls
B & D Pancreatic Cancer

Peak m/z 5959:
Identification ongoing

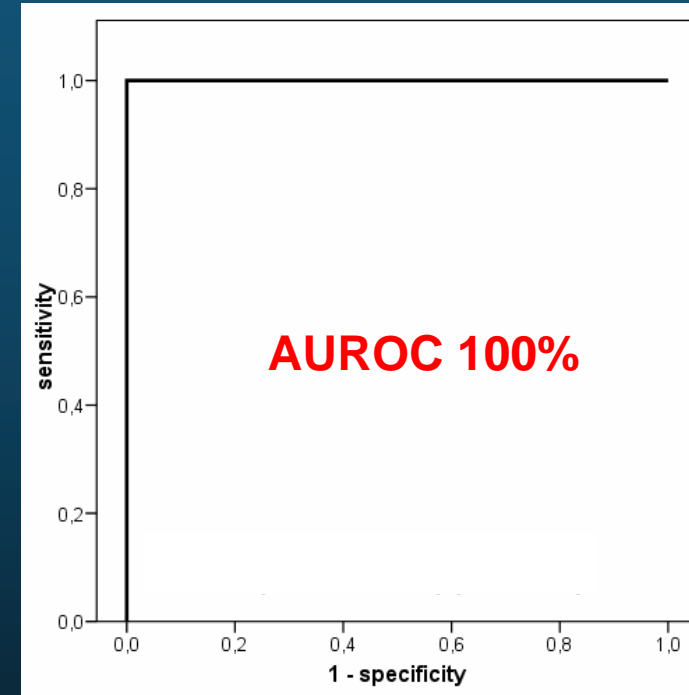
PF4 enhances sensitivity and specificity



Conventional markers
CA19-9 and **CEA**

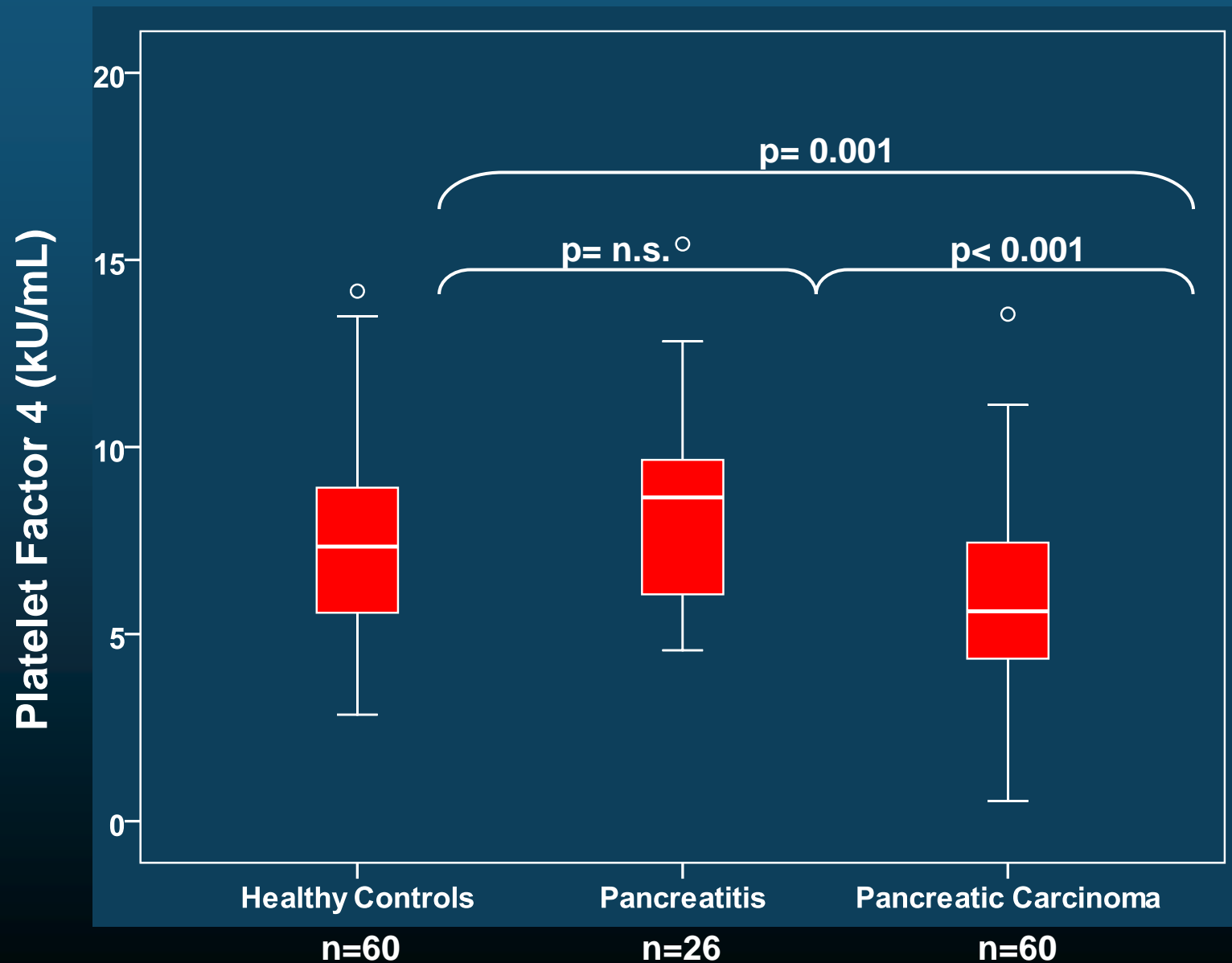


Conventional markers
CA19-9 and **CEA**
+ Peak **m/z 5959**



Conventional markers
CA19-9 and **CEA**
+ Peak **m/z 3884 (PF4)**

PF4 replication by ELISA



Neue Biomarker für die Laboratoriumsmedizin

1. Prozess der Biomarkervalidierung
2. Non-target Proteom-Analytik
3. Genomweite Analytik
4. Ausblick: Identifizierung neuer Zielmoleküle für Zivilisationskrankheiten (Landesexzellenzinitiative LIFE)

Myokardinfarkt



Gesunde Kontrollen



**Genomweite
SNP-Chips 1000K**

Genomweite Assoziationsanalyse (GWA):

Gibt es Unterschiede in der Verteilung von Genvarianten?

**Signifikant identifizierte
Kandidatengenvarianten**

The problem:

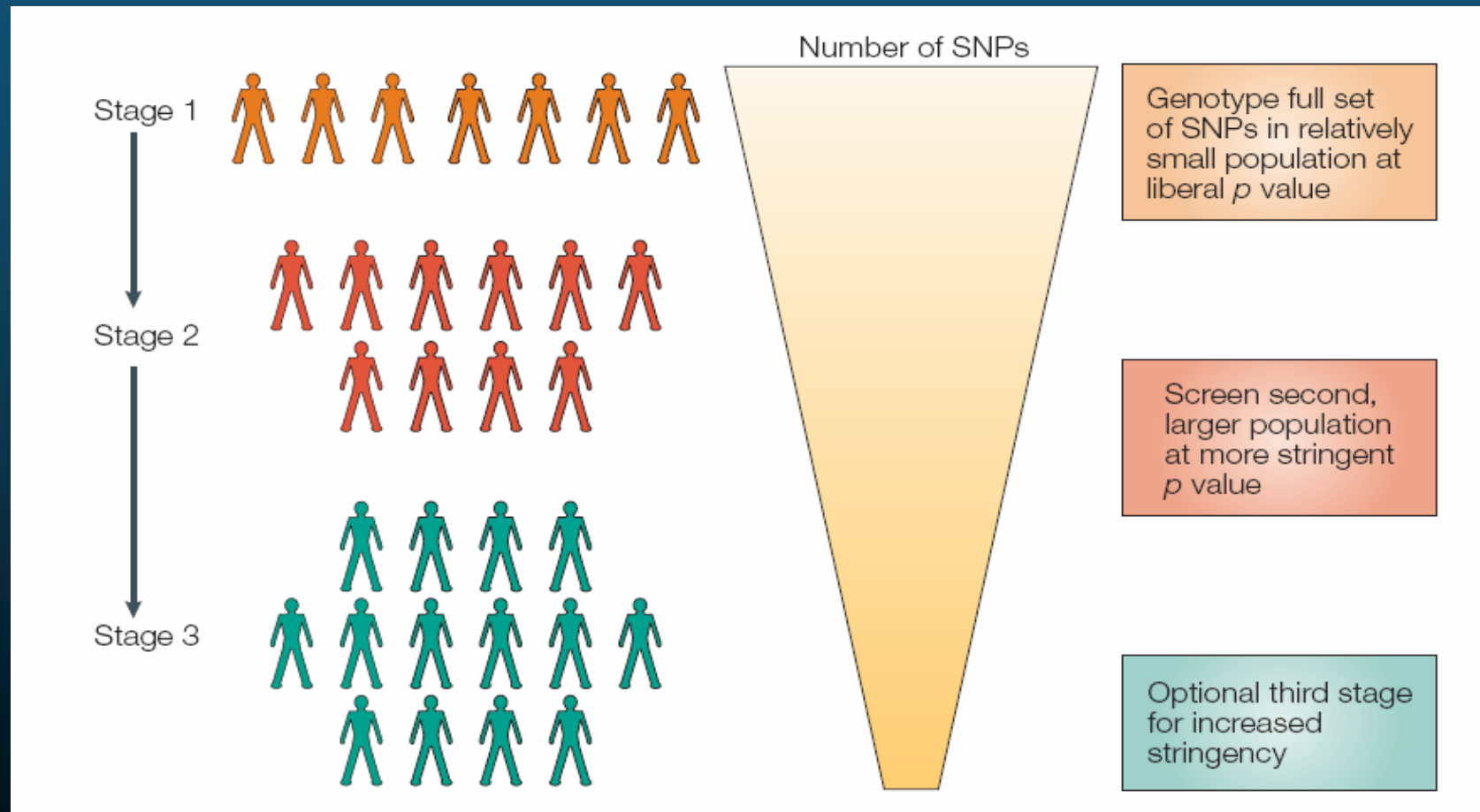
False positives due to multiple testing

- Consider $p=0.05$ as significant
- 1 out of 20 associations (5%) will be positive by chance
- In a 500k analysis 25000 will be termed „significant“ by chance

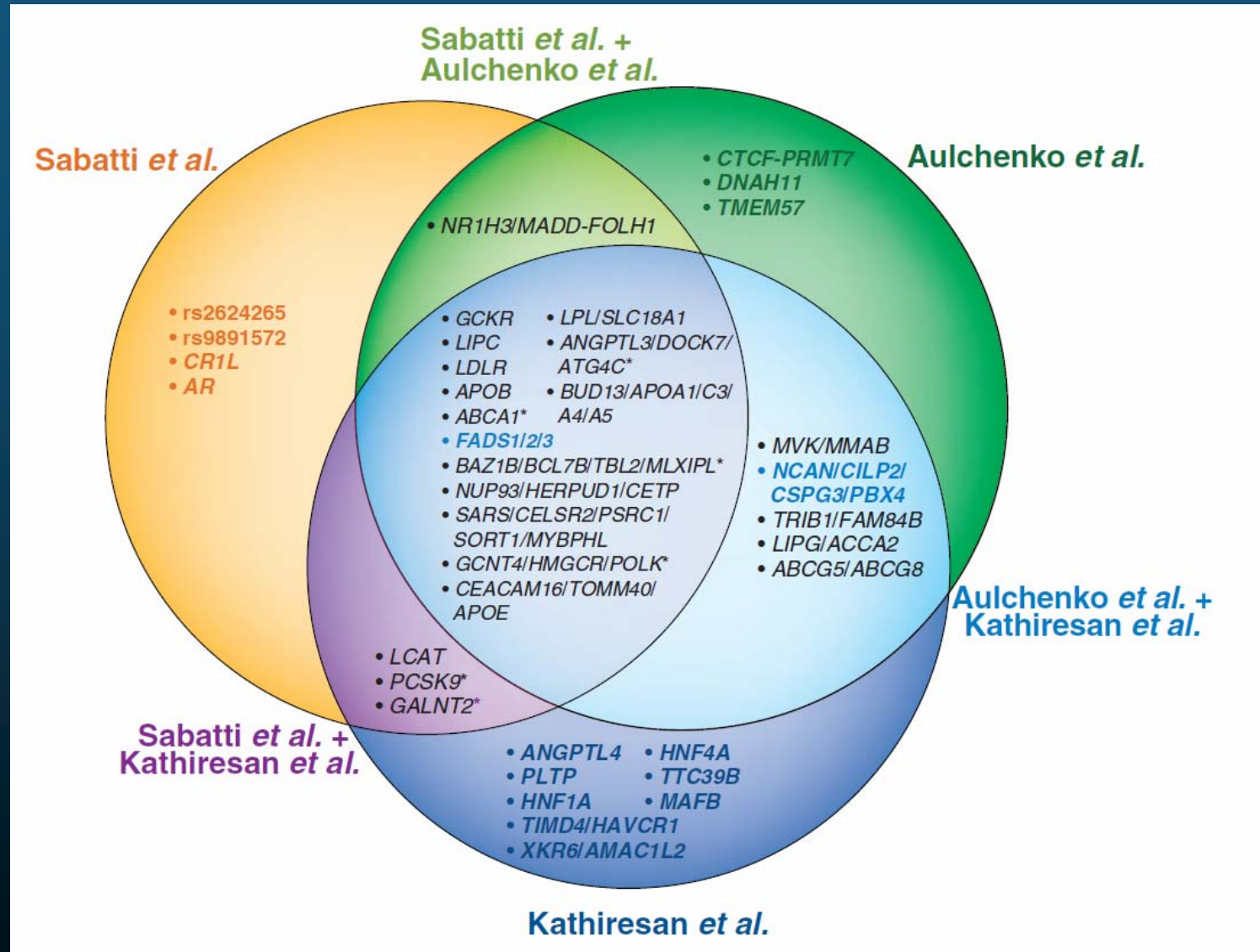
Problem Bioinformatik



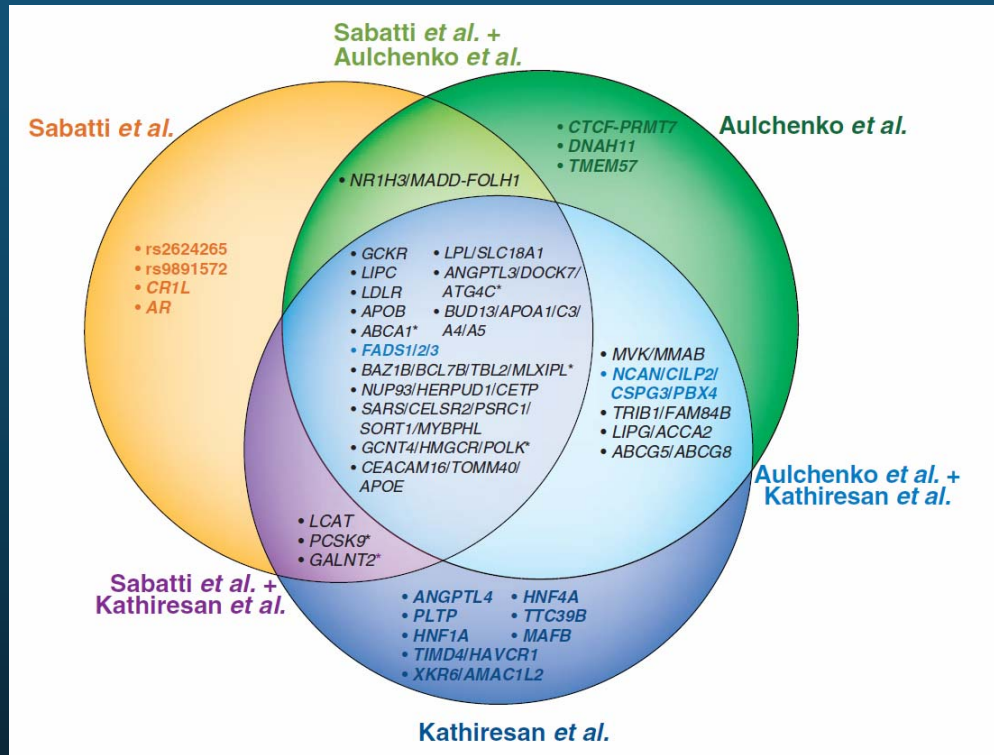
The solution: Multi-stage design



Neue Biomarker-Kandidaten für Stoffwechselstörungen



Neue Biomarker-Kandidaten für Stoffwechselstörungen



Verifizierung durch

- Funktionelle Genetik
- Gezielte Proteom- und Metabolomanalytik in Patientenkohorten
- Interventionsstudien

Neue Biomarker für die Laboratoriumsmedizin

1. Prozess der Biomarkervalidierung
2. Non-target Proteom-Analytik
3. Genomweite Analytik
4. **Ausblick: Identifizierung neuer Zielmoleküle für Zivilisationskrankheiten (Sächsische Landesexzellenzinitiative „LIFE“)**

Gene, Umwelt, Lebensstil?



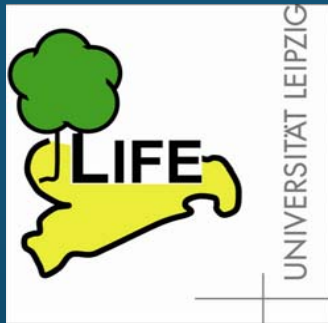
39 Jahre † (Herzinfarkt)



91 Jahre † „no sports“

Welche Faktoren bedingen die Variabilität der Krankheitsausprägung und des Verlaufes?

Sächsische Landesexzellenzinitiative 2009-2013



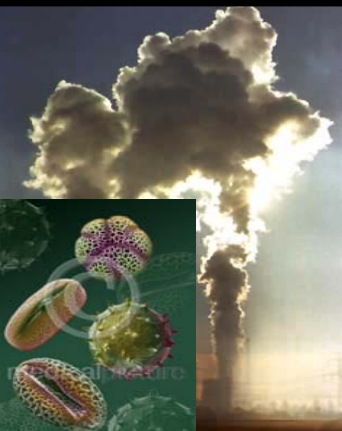
Leipziger Interdisziplinärer Forschungskomplex zu molekularen Ursachen umwelt- und lebensstilassoziierter Erkrankungen („LIFE“)

Förderung: 38 Mio € (2009-2013); EU/Freistaat Sachsen

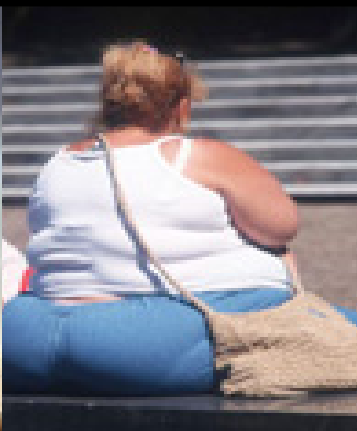
Ziel: Neue diagnostische und therapeutische Zielmoleküle für Zivilisationskrankheiten

Sprecher: Prof. Joachim Thiery (Labormedizin), Prof. Markus Löffler (Informatik)

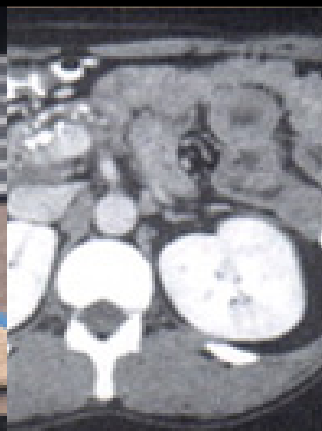
Ort: Universität Leipzig/Universitätsklinikum Leipzig



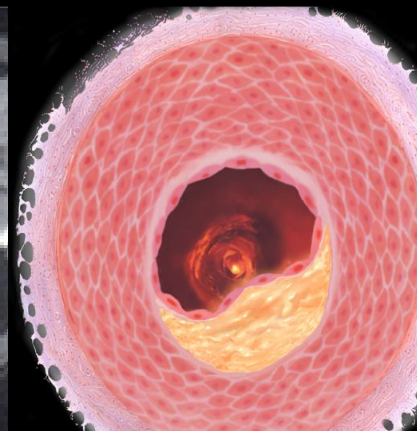
Allergie



Adipositas



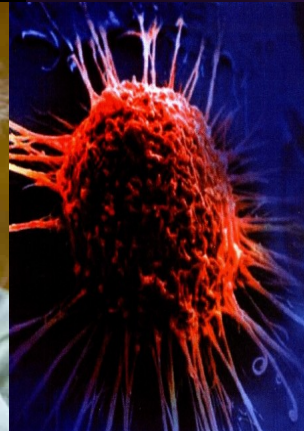
Pankreatitis



Atherosklerose



Depression/Demenz



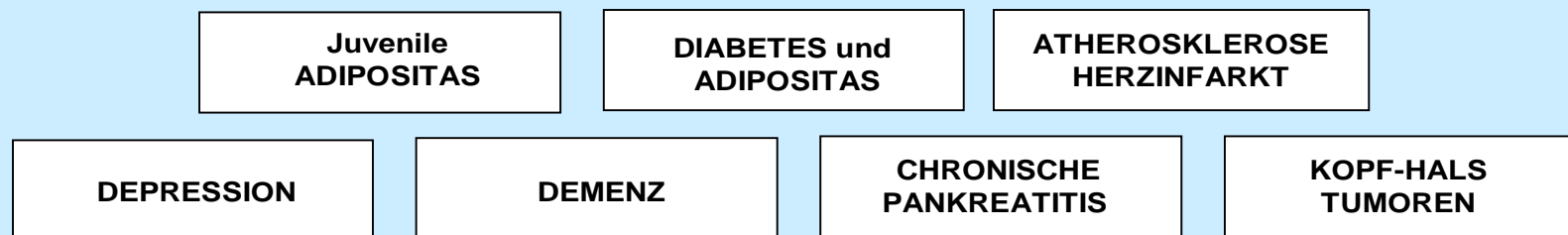
Krebs

LIFE-Arbeitsprogramm

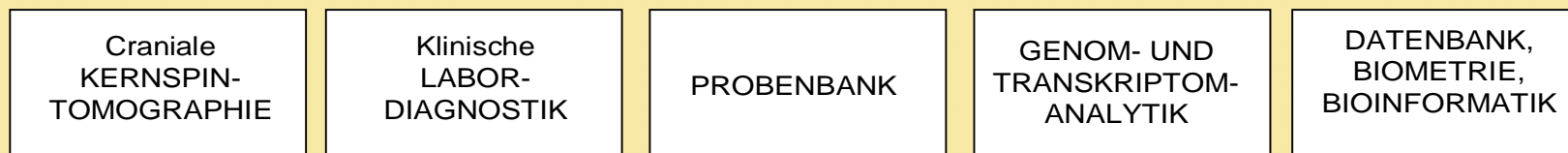
(M) LIFE Management

(A) LIFE-HEALTH (Leipziger Bevölkerungsstichprobe)
 ADULT: Erwachsene geschlechts- und altersstratifiziert (40-80J), n=10.000 Probanden
 CHILD: Kinder- und Jugendliche, geschlechts- und altersstratifiziert (0-18J), n=5.000
 Lebensstil- und Umwelterfassung, umfassende Phänotypisierung (Klinik, Bildgebung, Labor)

(B) LIFE-DISEASE 7 Krankheitskohorten, insgesamt 17.000 Pat. (6000 aus LIFE-HEALTH)



(C) LIFE-ANALYSIS (Zentrale Daten- und Probenbank, Labor- und Datenanalyse)

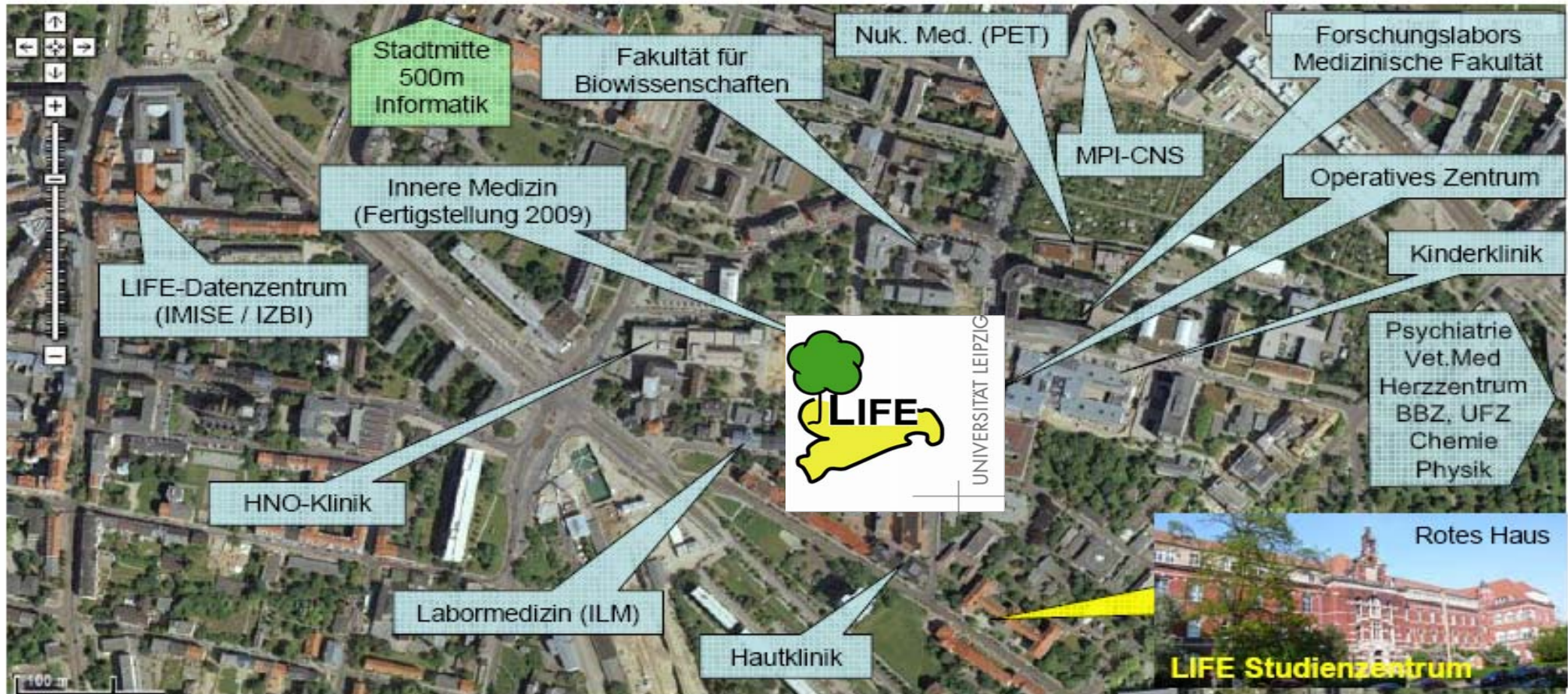


+ 2 Professuren + 2 Nachwuchsgruppen

(D) LIFE-FUNCTION Strukturaufklärung, Mechanismen, Produkt/Verfahrensentwicklung.
 Modellsysteme für die LIFE-Krankheiten. Neue Drug-Targets, Technologien, Testsysteme.
 + 2 Nachwuchsgruppen.

(E) LIFE-TRANSFER Medizinische und wirtschaftliche Anwendung.
 Technologietransfer zur Weiterentwicklung von Produkten, Verfahren und Dienstleistungen.

Alles an einem Standort im „Medizinischen Viertel“ Universitätsmedizin Leipzig





www.dgkl2009.de

7.-10. Oktober 2009 • Congress Center Leipzig



Wissenschaftlicher Kongress mit praktischen Kursen und Workshops
Fachmesse für Labordiagnostik und Bioanalytik

Moderne Labordiagnostik für
eine individualisierte Medizin

<http://conventus.de/dgkl2009>



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



UNIVERSITÄT LEIPZIG

Deutsche
Forschungsgemeinschaft
DFG



Nationales
Genomforschungsnetz





Herausforderungen an einen Biomarker

Beispiel Tumorerkrankung

