



Erforschung und Versorgung von Atemwegserkrankungen – Potenziale der molekularbiologischen Diagnostik

Prof. Dr. Oliver Schildgen

**Kliniken der Stadt Köln gGmbH
(Klinikum der Privaten Universität Witten/Herdecke)**



*„Er hustete so hohl, dass man in jedem
Laut den doppelten Resonanzboden
Brust und Sarg mitzuhören glaubte“*

Georg Christoph Lichtenberg, 1742-1799, dt. Schriftsteller, Kunstkritiker
und Physiker

*„Man sollte niemals zum Arzt gehen,
ohne zu wissen, was dessen
Lieblingsdiagnose ist.“*

Henry Fielding, 1707-1754, engl. Schriftsteller

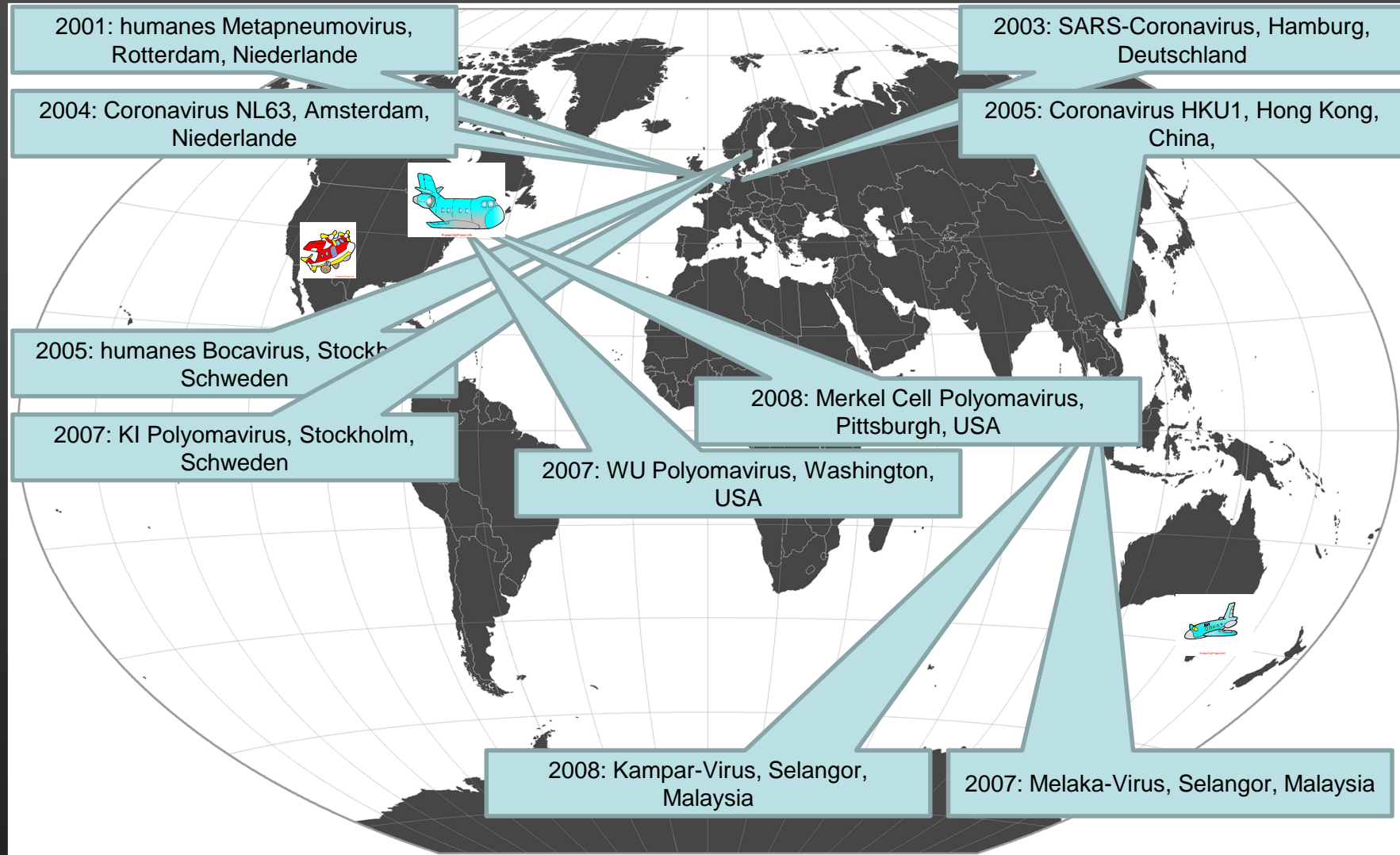


Herausforderungen

- Virale Atemwegserkrankungen
- Tumorerkrankungen der Lunge



Virus-Erstbeschreibungen seit 2001





- Erreger-Charakterisierung
- Problem der Koch'schen Postulate
 - Ist das Pathogen auch wirklich übertragbar und macht krank?
- Analogschlüsse zum Vermehrungszyklus basieren auf Daten zu „verwandten“ Viren und werden oft nicht hinterfragt
- Anpassung der Labor-Diagnostik
- In Deutschland: Kompetenzgerangel (Mikrobiologie, Virologie, Laboratoriumsmedizin, Pathologie, niedergelassenes Labor, Ärztevorbehalt)



HBoV - Steckbrief

- Erstbeschreibung 2005 durch Tobias Allander, Karolinska Institut, Stockholm
- Zweites bekanntes humanes Parvovirus (nächster humanpathogener Verwandter: B19)
- ssDNA, ca. 5.5 kb, hairpin-loops noch nicht bekannt, 4 Subtypen
- Klinik: assoziiert mit Atemwegsinfektionen, Gastrointestinalen Infektionen
- Oft als Kopathogen gefunden





Diagnose (nach Lehrbuch)

- Influenza?
- Grippaler Infekt
 - Respiratorisches Syncytial Virus
 - Parainfluenzaviren (1-4)
 - Picornaviren (Rhino, Entero, etc.)
 - Adenoviren
 - Herpesviren, Masern, Hanta?
 - Bakterien?



Emerging Respiratory Viruses

- Humanes Metapneumovirus (HMPV/hMPV)
- Humane Coronaviren
 - NL63
 - HKU1
 - SARS
- Humanes Bocavirus (HBoV/hBoV)
- Polyomaviren
 - KI
 - WU
- Influenzavirus H5N1, H1N1, ?



Probleme bei Diagnostik und Therapie

- **Probenmenge**
- **Kultivierbarkeit der Erreger eingeschränkt**
- **Anzahl Erreger (Σ „alte + neue“ Erreger > 50)**
 - => Multiplexing**
 - => Sensitivitätsverluste**
- **Co-Infektionen**
 - **Echte Monoinfektionen sind selten (Beispiel HBoV und Adenoviren)**
- **Behandlung**
 - **Antibiotika oder Virustatika (RSV, Influenza)**
 - **Wann und wie schnell?**
 - **Welche Labore liefern valide Daten zu allen relevanten Erregern?**



Was wäre notwendig?

- Kostengünstige, schnelle und umfassende Erreger-Diagnostik, die alle relevanten Erreger abdeckt
- Konsens über die Relevanz der Erreger
- Kommunikation mit Einsendern
 - Erreger war bisher nicht relevant, warum jetzt
 - Wir können eh nicht therapieren...



- Zellkultur
 - Nicht alle Erreger kultivierbar
 - Aufwändiges Verfahren (verschiedene Zelllinien notwendig)
 - z.T. lange Wartezeiten
- Direkte Immunfluoreszenz
 - Oft geringe Sensitivität
- ELISA
- Indirekte Immunfluoreszenz
- Einzel-PCR/RT-PCR
 - Qualitative und/oder quantitativ
 - Ökonomisch nur bedingt zu vertreten
- Multiplex-Verfahren
 - Bead-basiert: Luminex RVP, ResPLEX II
 - Kapillargelelektrophorese: RespiFinder
 - MALDI-TOF: PLEX-ID



Bedeutung der Diagnostik

- Therapie-Entscheidung
 - Virusstatikum (Tamiflu/Relenza, Amantadin/Rimantadin, Cidofovir), passive Immunisierung, humanisierte Antikörper oder Antibiose?
 - Vermeidung von Resistenzen
 - Vermeidung falscher Therapien (Reye-Syndrom durch ASS bei Influenza)
- Eindämmung von Ausbrüchen
 - Lokal, regional, überregional, nosokomial
 - Isolierungsmaßnahmen?
 - Sicherheitsmaßnahmen?
- Vermeidung falscher Antibiotika-Gaben
 - Resistenzvermeidung
 - Senkung der Antibiotikakosten

- Was ist teurer, Antibiotika (mit nachfolgenden Resistenzen) oder Diagnostik?



Tumorerkrankungen der Lunge

DISCOVERY MEDICINE

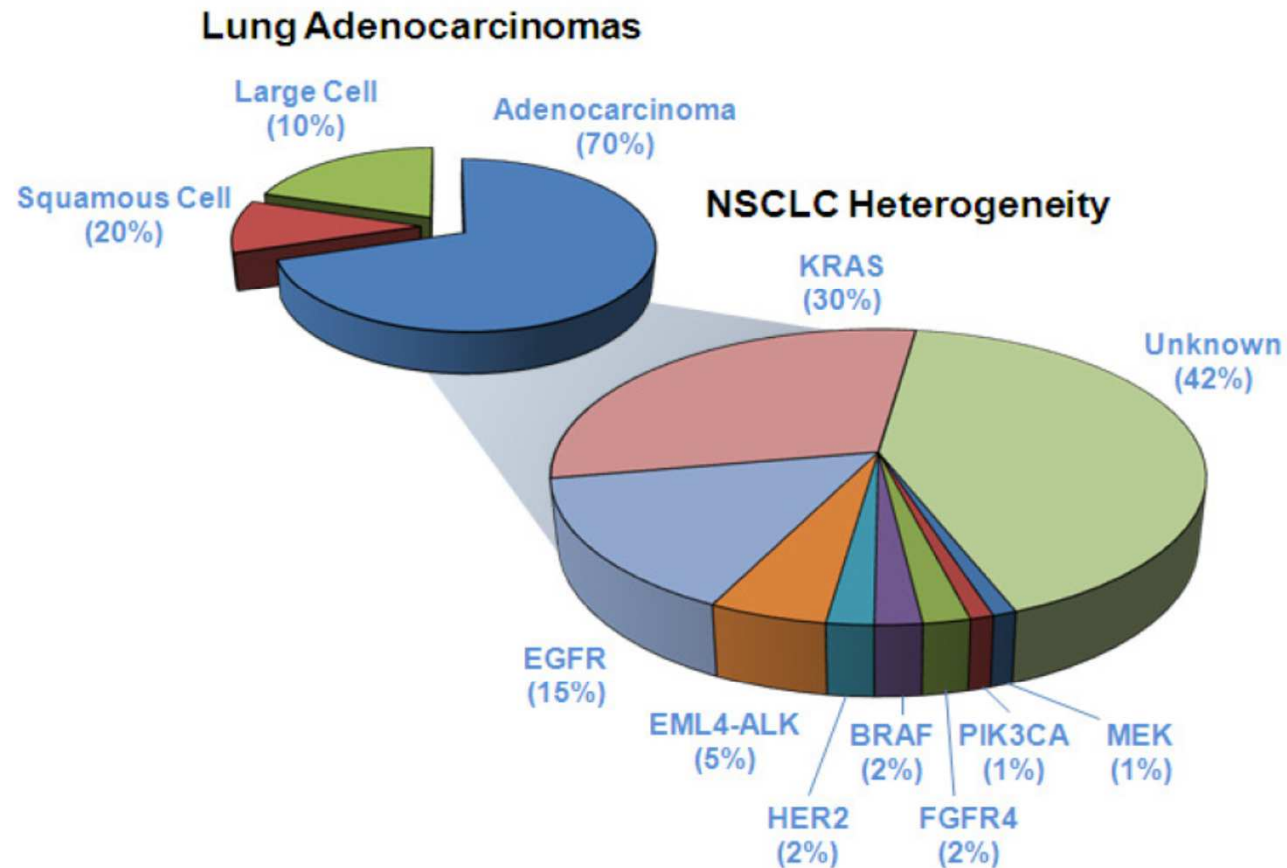


Figure 1. Stratification of lung cancer patients by mutations and/or over-expression of various oncogenes.

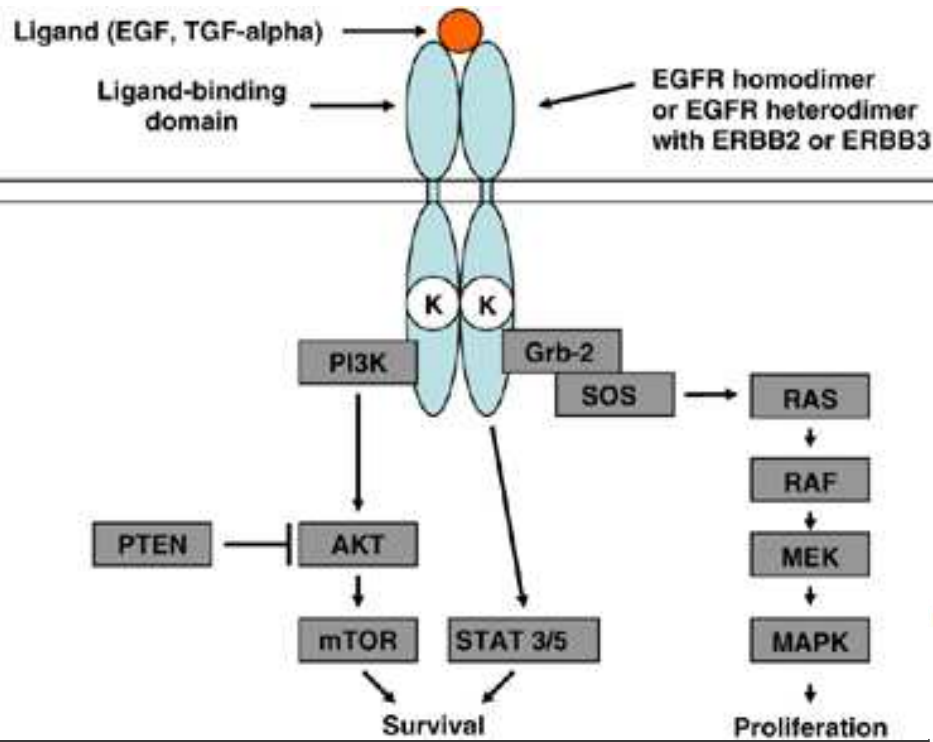
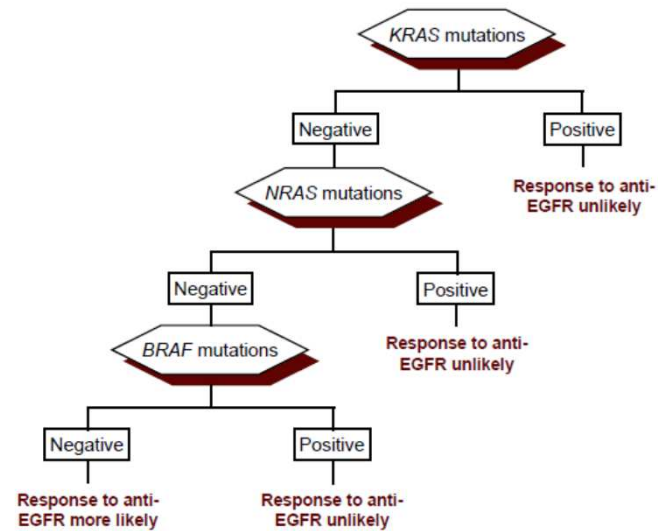


Figure. Mutation testing cascade for patients who are candidates for EGFR antagonist therapy.





- Fokus auf non-small cell lung cancer NSCLC
- Pro neuer Therapiezulassung mindestens ein neu geforderter molekularer Test
- Jetzt bereits relevant:
 - KRAS (Material-Kosten ca. 90 €)
 - NRAS (Material-Kosten ca. 90 €)
 - BRAF (Material-Kosten ca. 70 €)
 - EGFR (Material-Kosten ca. 120 €)
 - ALK-Status (Material-Kosten ca. 100 €)
 - PIK3CA (Material-Kosten ca. 80 €)

 - Erfahrung mit klinischen Fällen zeigt, dass eigentlich alle Parameter getestet werden müssen

 - Therapiekosten: z.B. Crizotinib (ALK-Testung): 8.000 € pro Monat



- Immer mehr relevante Mutationen
- Immer mehr Mutationen unklarer Relevanz (Polymorphismen)
- Keine einheitlichen Definitionen (Polymorphismus, Mutation)
- Sich angeblich ausschließende Mutationen treten gemeinsam auf
- Einzelne Parameter schlecht definiert (alk-Translokation)
- Auswirkungen auf die Therapie unklar

- Jetzt würde „Maximal-Diagnostik“ gebraucht, um den größtmöglichen Lerneffekt zu erzielen und langfristig Kosten einzusparen

- Ethische Zwickmühle: mögliche Diagnostik vs. Kostendeckelung

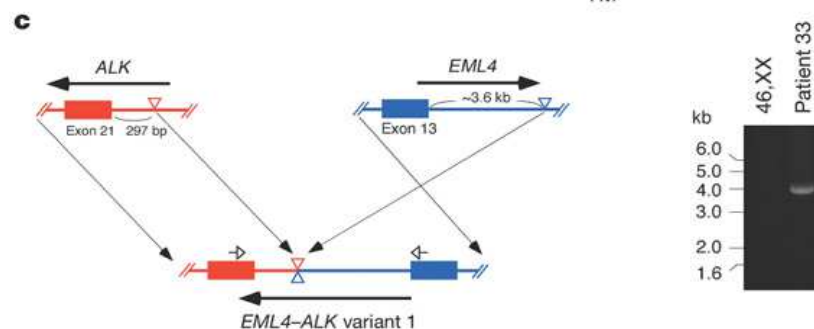
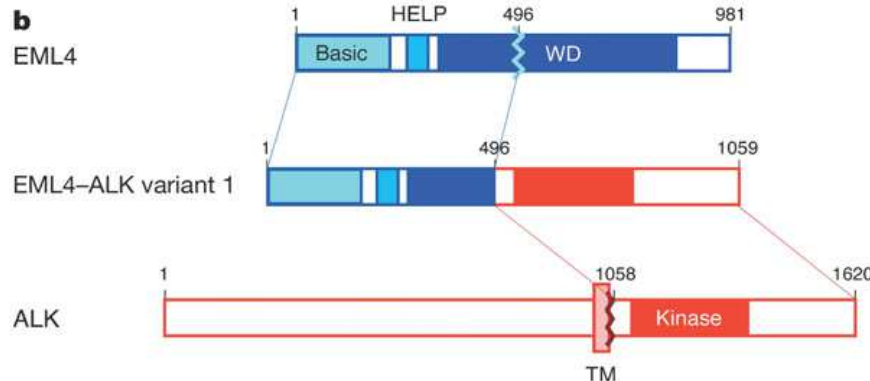
- Ethisches Problem: Gendiagnostikgesetzgebung



EML4-ALK

a

```
MDGFAGSLDDSIISAASSTSDVQDRLSALESRVQQQEDEITVKAALADVLRLRAISEDHVA 60
SVKKSVSXKQGPSRAVIMSCITNGSGANRKPSSHTSAVSIAGKETLSSAAKSGTEKKKE 120
KPQGRKREKKEESHNDQSPQIRASPSQPSSQPLQIHRQTPESKNATPTKSIKRPSPA EK 180
SHNSWENSDSRNKLKIPSTPKLIPKVTKTADKHKDVIINQEGEYIKMFMGRPITMFI 240
PSDVDNYDDIRTELPEKLEWAYGYRGKDCRANVYLLPTGEIVYPIASVVVLPNYEER 300
TQRHYLGHTDCVKCLAIHPDKIRIATGQIAGVDRKDRPLQPHVRVWDSVTLSTLQIIGLG 360
TFERGVGCLDFSKADSGVHLCVIDDSNEHMLTVWDWQKKAKGAEIKTTNEVVLAVEFHPT 420
DANTIITCCGKSHIFFWTWGSNLSLTKQGIIFGKYEKPKFVQCLAFNGDVLGTGDSGGVML 480
IWSKTTVEPTPGKGPVYRRKHQELQAMQELQSPPEYKLSKLRSTIMTDYNPYCFAGK 540
TSSISDLKEVPRKNIITLIRGLGHGAPGEVYEGQVSGMNPDPSPQLQVAQTLPVCSQDE 600
LDFLMEALIIISKFNHQNIVRCIGVSLQSLPRFILLELMAGGDLKSFLETRRPRPSQPSL 660
AMLDDLHVARDIACGCQYLEENHFHHRDIAARNCLLTCPCGGRVAKIGDFGMARDIYRAS 720
YYRKGCCAMLPVKWMPPEAFMEGIPTSKTDWTFVLLWEIFSLGYMPYPSKSNQEVLEF 780
VTSGGRMDPPKNCPCGPVYRIMTQCWQHQPEDRPNFALIERIEYCTQDDVINTALPIEY 840
GPLVEEEEKVPVRPKPEGVPLLVSQAKREERSPAAPPPLPTSSGKAAKKPTAAEV 900
SVRVPRGPAVEGGHVNMAFSQSNPPSELHRVHGRNKPSTLWNPYGSWFTEKPTKKNP 960
IAKKEPHERGNLLEGSCVPPNVATGRLPGASLLEPSSLTANMKEVPLFRLRHFFCGN 1,020
VNYGYQQQLPLEAATAPGAGHYEDTILKSKNSMNQPGP 1,059
```



EML4 (2p21)

→ echinoderm microtubule associated protein like 4

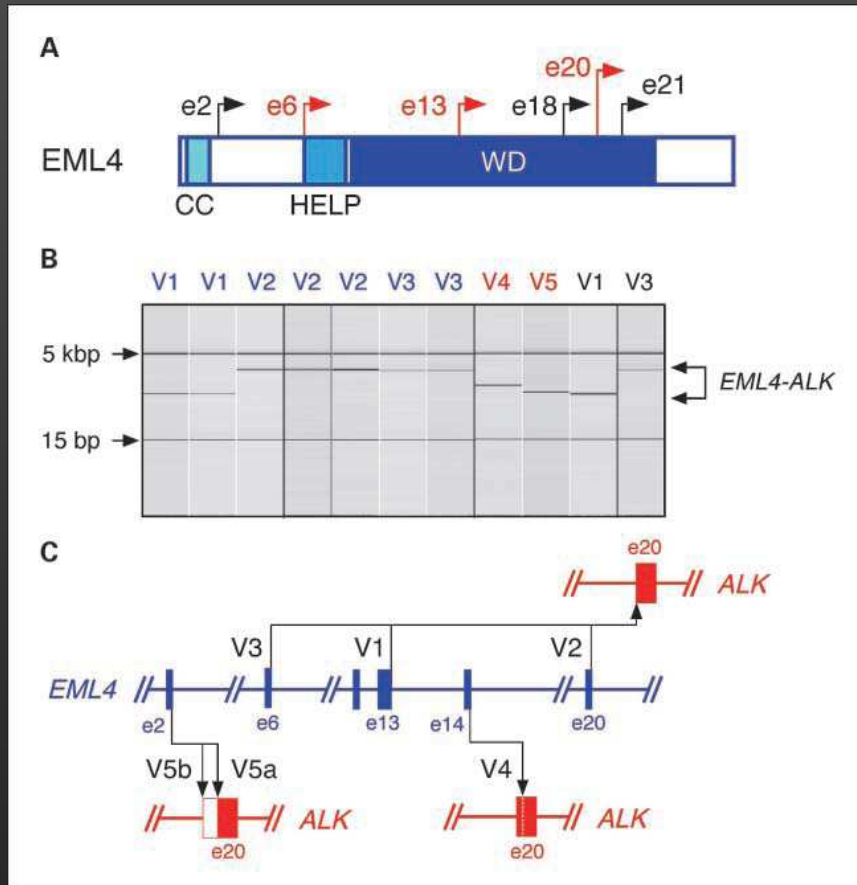
Alk (2p23)

→ anaplastic lymphoma kinase

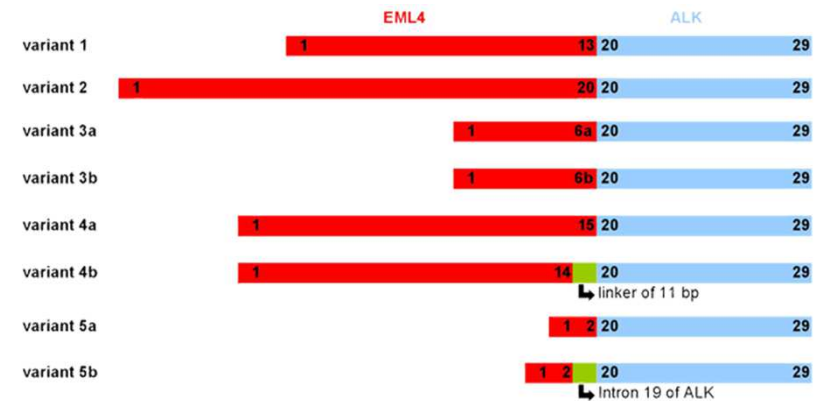
Fusionsprotein wird bei Patienten ohne EGFR- bzw. KRAS-Mutationen gefunden

ALK tritt häufig als Fusionspartner in onkogenen Proteinen auf

EML4-ALK: Transkriptvarianten



Takeuchi *et al.*, Clin Cancer Res 2008



EML4-ALK fusion isoforms (numbers = exon number).

Known variants

Variant 1: exon 1-13 (EML4) + exon 20-29 (ALK)

Variant 2: exon 1-20 (EML4) + exon 20-29 (ALK)

Variant 3a: exon 1-6a (EML4) + exon 20-29 (ALK)

Variant 3b: exon 1-6b (EML4) + exon 20-29 (ALK)

Variant 4a : exon 15 (EML4) + exon 20-29 (ALK)

Variant 4b : exon 14 (EML4) + linker of 11bp + exon 20-29 (ALK)

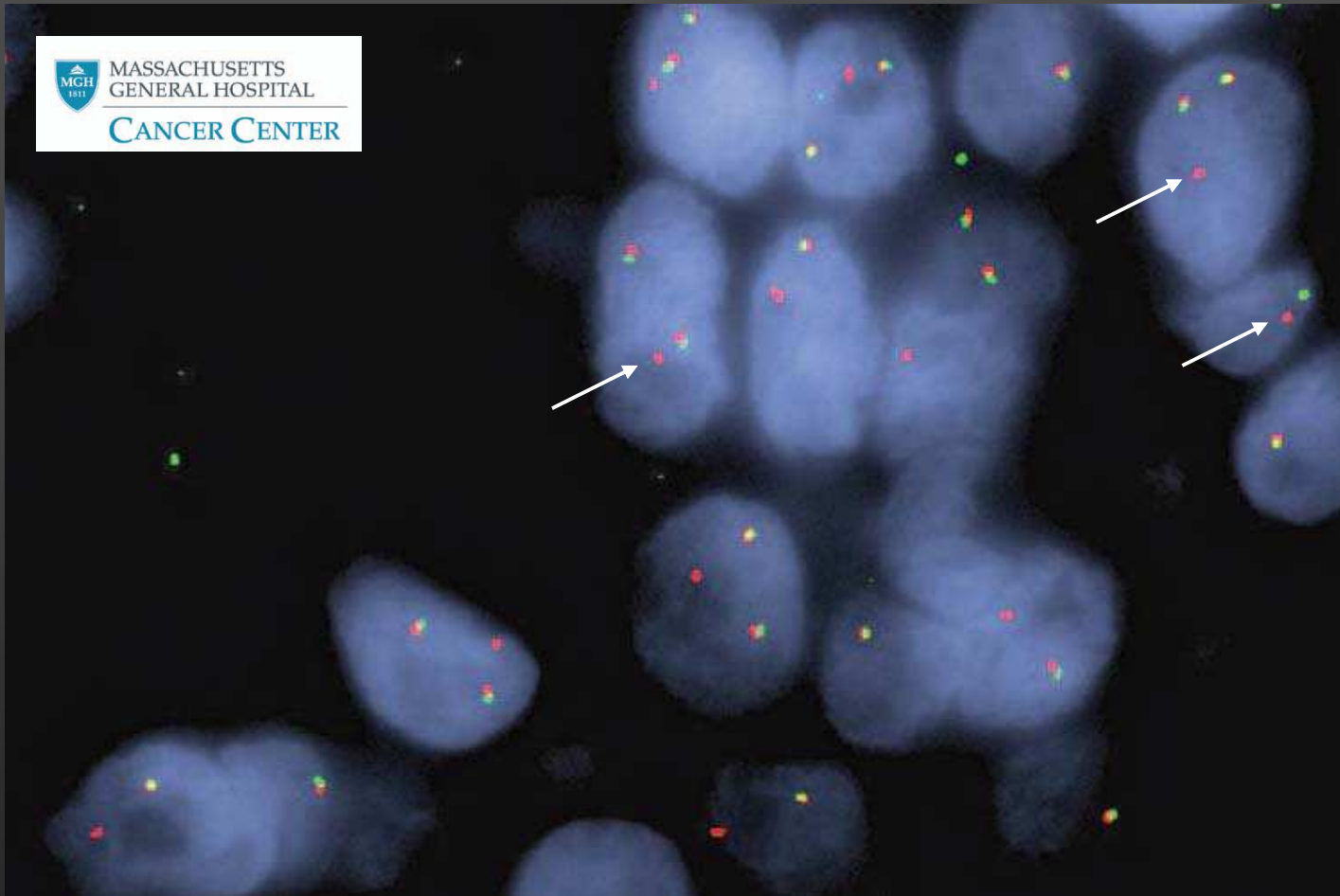
Variant 5a : exon 2 (EML4) + exon 20-29 (ALK)

Variant 5b : exon 2 (EML4) + intron 19 (ALK) + exon 20-29 (ALK)

Perner *et al.*, Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2009



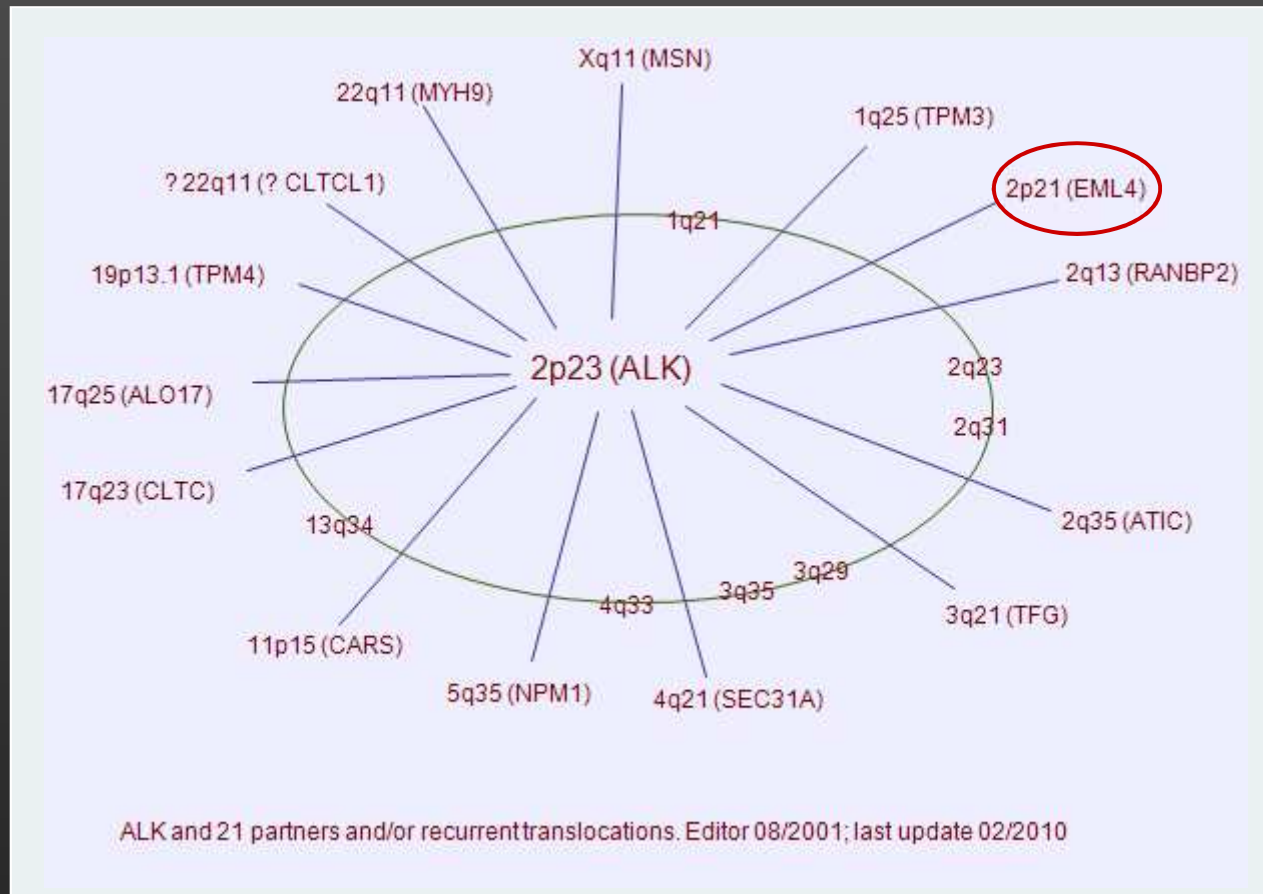
EML4-ALK: FISH



These tumor cell nuclei (blue) display the ALK mutation. Normal ALK gene copies appear as overlapping (yellow) or adjacent green and red probes. Unpaired red probes (arrows) indicate a broken segment of the ALK gene joined to another part of the genome, creating a mutation that can be targeted therapeutically.

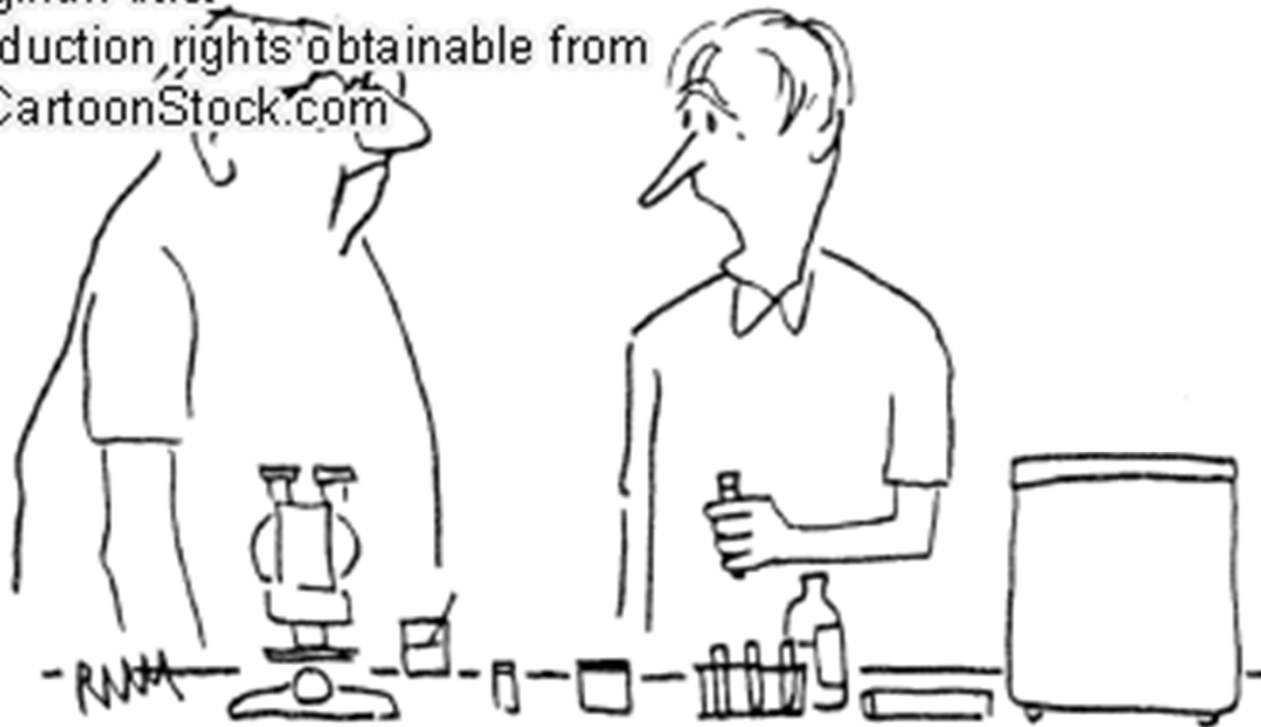


EML4-ALK



Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2010

© Original Artist
Reproduction rights obtainable from
www.CartoonStock.com



search ID: rmin1140

"I've narrowed the diagnosis down to 16 possibilities."