

Lino Möhrmann
Dr. med.

Biologie und prognostische Bedeutung disseminierter kolorektaler Tumorzellen und deren Bestandteile im Knochenmark und peripheren Blut

Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanno Glimm

Das kolorektale Karzinom ist aktuell trotz Einführung der Vorsorge-Koloskopie ab 55 Jahren eine der häufigsten Krebsarten in Deutschland. Die Heilungschancen durch Operation und Chemotherapie hängen stark vom Stadium der Erkrankung ab. Zielgerichtete Medikamente spielen bislang lediglich in der Palliativtherapie eine Rolle. Obwohl das Knochenmark kein typischer Ort der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms ist, disseminieren einzelne Zellen dorthin und können ihr tumorigenes Potential behalten. Bislang war völlig unklar, wo diese Zellen lokalisiert sind und welche Proliferationsaktivität sie haben.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher die Lokalisation und Proliferationsaktivität von disseminierten kolorektalen Tumorzellen im Knochenmark durch Xenotransplantation von Sphäroidkulturen in immundefiziente NSG Mäuse und anschließende Analyse mittels Immunfluoreszenzfärbungen von Knochenmarksschnitten untersucht. Dabei konnte bei 8 von 10 der verwendeten Tumorsphäroidkulturen gezeigt werden, dass einzelne Tumorzellen im Knochenmark der transplantierten Mäuse vorliegen. Des Weiteren konnte eine perivaskuläre Lokalisation der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark *in vivo* gezeigt werden. Im Gegensatz dazu war die Lokalisation nicht mit dem Endosteum (markiert durch Osteopontin) oder mit hämatopoetischen Stammzellen (lineage⁻ CD48⁻ CD150⁺) assoziiert. Die mittels Ki-67 Expression ermittelte Proliferationsaktivität der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark war ähnlich der Proliferationsaktivität der Tumorzellen im Primärtumor. Die perivaskuläre Lokalisation bietet damit einen potentiellen Angriffspunkt für potentielle Manipulationen der Interaktion von kolorektalen Tumorzellen und Endothelzellen durch spezifische Inhibitoren, um das Rezidivrisiko bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zu senken.

Zwar lassen sich disseminierte bzw. zirkulierende Tumorzellen im Blut auch für liquid biopsy Ansätze nutzen, jedoch hat die Analyse von exosomalen Nukleinsäuren den Vorteil, dass für diese keine Dissemination von Tumorzellen in den Blutstrom notwendig ist. Sowohl lebende als auch apoptotische oder nekrotische Zellen sezernieren exosomale Nukleinsäuren, welche sich im Blut detektieren lassen. Liquid biopsy Ansätze, die auf der Analyse von Blutproben basieren, ermöglichen einen einfachen Zugang zu genetischem Material für die molekulare Diagnostik. Sie sind daher ein potentiell sehr nützliches Tool für die Diagnostik und das Monitoring bei Krebspatienten.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher eine neue Methode zur Analyse von exosomalen Nukleinsäuren im Plasma von Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen im Rahmen einer klinischen Studie analysiert. Knapp die Hälfte der Patienten (47%) hatte ein kolorektales Karzinom. Die in bisherigen Ansätzen meist verwendete zellfreie DNA wird dabei jedoch nur von apoptotischen oder nekrotischen Zellen freigesetzt. Exosomale Nukleinsäuren hingegen stammen auch von lebenden Zellen, da diese stets Exosome abschnüren. Damit kann die Analyse exosomaler Nukleinsäuren die zu Grunde liegende Biologie des Krebses potentiell besser darstellen als dies die Analyse zellfreier DNA vermag. In der vorliegenden Arbeit wurden exosomale Nukleinsäuren aus dem Plasma von insgesamt 43 Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen mittels Next-Generation Sequencing auf *BRAF*^{V600}, *KRAS*^{G12/G13} und *EGFR*^{exon19del/L858R} Mutationen untersucht. Diese wurden sowohl mit den Ergebnissen aus Analysen von zellfreier DNA derselben Patienten mittels droplet digital Polymerasekettenreaktion und BEAMing Polymerasekettenreaktion als auch mit den Ergebnissen aus der Testung von Gewebestücken verglichen. Die dabei festgestellten Ergebnisse wurden außerdem mit dem Gesamtüberleben, der Zeit bis zum Behandlungsversagen und dem (radiografisch feststellbaren) Ansprechen korreliert. 41 Patienten hatten *BRAF*, *KRAS*, oder *EGFR* Mutationen im Tumorgewebe, welche zu 95% mittels Next-Generation Sequencing in exosomalen Nukleinsäuren, zu 92% mittels droplet digital Polymerasekettenreaktion und zu 97% mittels BEAMing Polymerasekettenreaktion in zellfreier DNA detektiert werden konnte. Patienten mit einer niedrigen Mutationsallelfrequenz in exosomalen Nukleinsäuren hatten ein signifikant längeres medianes Gesamtüberleben und eine signifikant längere Zeit bis Behandlungsversagen als Patienten mit einer hohen Mutationsallelfrequenz. Eine niedrige Mutationsallelfrequenz in exosomalen Nukleinsäuren korrelierte außerdem mit partiellem Ansprechen auf Therapie und stabiler Erkrankung für mindestens 6 Monate. Damit konnte gezeigt werden, dass die Analyse von Hotspot Mutationen in exosomalen Nukleinsäuren im Plasma nicht nur möglich, sondern auch der Analyse von zellfreier DNA mindestens ebenbürtig ist. Da der ermittelte Mutationsstatus weitgehend in Einklang mit dem Mutationsstatus in bereits zu einem früheren Zeitpunkt archivierten Gewebeproben war, ist die Analyse exosomaler Nukleinsäuren eine vielversprechende zusätzliche Methode für zukünftige klinische Anwendungen. Durch diese simple, regelmäßig anwendbare und nebenwirkungsarme Methode lassen sich wertvolle Aussagen über das Ansprechen auf die Therapie und die Prognose des Patienten treffen.