

Louise Appenheimer
Dr. med.

Characterization of cell-free DNA and RNA release dynamics in lung adenocarcinoma cells

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Holger Sültmann

Die Charakterisierung onkogener Treibermutationen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) und die darauffolgende Entwicklung zielgerichteter Therapien haben die Prognose betroffener Patient*innen maßgeblich verbessert. Zu den häufigsten molekularen Alterationen gehören Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens (EGFR) und Fusionen des Anaplastische Lymphomkinase Gens (ALK). Beide Veränderungen modulieren die Funktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen und können mittels für die Erstlinientherapie zugelassenen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) gezielt behandelt werden. Nach initialem Therapieansprechen kommt es jedoch meist zur Resistenzentwicklung, welche eine Anpassung der therapeutischen Strategie verlangt. Dementsprechend sind die molekulare Charakterisierung und eine dahingehende kontinuierliche Therapieüberwachung besonders relevant in der Behandlung dieser beiden NSCLC Subtypen. Die Analyse von Körperflüssigkeiten (Liquid Biopsy) hat in der Behandlung des NSCLC Einzug in die klinische Praxis gefunden, wo sie die molekulare Charakterisierung des Tumors durch nicht-invasive Analyse zirkulierender, zellfreier DNA (cfDNA) ermöglicht. Darüber hinaus werden andere Analyten wie zellfreie RNA (cfRNA) und extrazelluläre Vesikel (EVs) im Hinblick auf potenzielle Liquid Biopsies erforscht. Dabei ergeben sich einige technologische Hürden, wie zum Beispiel die limitierte Detektionssensitivität bei der Analyse von cfDNA. Zusätzlich sind einige biologische Grundsatzfragen bisher unzureichend erforscht, wie zum Beispiel die Selektivität von zellulärer Nukleinsäurefreisetzung, Einflussfaktoren auf die Freisetzung und die Assoziation extrazellulärer Nukleinsäuren mit diversen Trägermolekülen. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Dynamiken der Nukleinsäurefreisetzung anhand der EGFR-mutierten H1975 NSCLC Zelllinie und der ALK-getriebenen H3122 NSCLC Zelllinie *in vitro* zu erforschen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die zelluläre Therapieantwort auf diverse zugelassene TKIs mittels Viabilitäts- und Zelltod-Assays sowie durch Zellzyklusanalyse genau charakterisiert. Hierbei ergab sich ein primär zytostatischer Wirkmechanismus der TKIs ohne deutlichen apoptotischen oder zytotoxischen Zelltod in den ersten 72 Stunden der Behandlung. Dementsprechend ist Zelltod als Einflussfaktor auf die Nukleinsäurefreisetzung in den frühen Phasen der Therapieüberwachung zugunsten anderer Mechanismen weniger zu gewichten. Darüber hinaus wurden die Selektivität der cfRNA-Freisetzung sowie die Assoziation von cfRNA mit EVs am Modell der TKI-behandelten H3122 Zelllinie mittels RNA-Sequenzierung exploriert. Hier zeigte sich eine ungleiche Verteilung von diversen RNA-Biotypen in EVs, dem generellen extrazellulären Profil und der Ursprungszelle, darunter mitochondriale RNA, transfer-RNA, small nuclear RNA, small nucleolar RNA and long non-coding RNA. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Fragmente von messenger RNA (mRNA) neben ribosomaler RNA den prädominanten RNA-Biotyp im extrazellulären Raum darstellen. Durch differenzielle Expressionsanalyse konnte die selektive Anreicherung beziehungsweise Depletion von mRNAs

im extrazellulären Raum und daraus resultierende spezifische mRNA-Profile im Vergleich zur Zelle beschrieben werden. Der Abgleich der EV-assoziierten mRNAs mit entsprechenden Genproduktattributen suggerierte die Präsenz von nuklearen Bestandteilen und Komponenten morphogenetischer Signalwege in EVs. Insgesamt wurden EVs als eine komplexe Quelle von mRNA-Fragmenten charakterisiert, welche die Ursprungszelle besser reflektieren als cfRNA im nicht angereicherten extrazellulären Raum. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich durch die TKI-Behandlung induzierte Veränderungen des v-Ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)-Signalwegs im extrazellulären Raum widerspiegeln. Die Freisetzung von microRNAs wurde als primär unselektiver Prozess charakterisiert, wobei einzelne microRNAs spezifisch freigesetzt und extrazellulär angereichert zu sein scheinen. Aufgrund der hohen Abundanz von mRNA-Fragmenten in den extrazellulären Kompartimenten, wurde der Nutzen von kombinierter cfDNA- und cfRNA-Analyse für die Mutationsdetektion am Beispiel der H1975 Zelllinie evaluiert. Mit Hilfe von digitaler PCR konnte durch die Kombination der beiden Analyten eine verbesserte Detektionssensitivität für mutierte EGFR-Kopien im Vergleich zur reinen cfDNA-Analyse erzielt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Mutationsanalyse auch mit EV-assoziierten cfRNA-Fragmenten möglich ist, während cfDNA nicht mit den isolierten EVs assoziiert zu sein scheint. Darüber hinaus wurden die Dynamik und zelluläre Einflussfaktoren auf die cfDNA-Freisetzung von H1975 Zellen untersucht. Während induzierte Apoptose zu einer Erhöhung der cfDNA-Freisetzung führte, zeigten lebendige Zellen eine mutmaßlich aktive Freisetzung von cfDNA. Die Behandlung mit TKIs führte ebenfalls zu einer Erhöhung der cfDNA-Freisetzung, trotz des zuvor charakterisierten, primär zytostatischen Wirkmechanismus ohne signifikante Apoptose oder Nekrose der Zellen.

Insgesamt illustrieren die Ergebnisse dieser Arbeit das Potenzial von extrazellulärer cfRNA und insbesondere EV-assoziiierter cfRNA als Informationsquelle durch Widerspiegelung ihres zellulären Ursprungs. Die Selektivität von cfRNA-Freisetzung wurde demonstriert und das Potenzial von mRNA-Fragmenten für Therapieüberwachung und Mutationsdetektion aufgezeigt. Ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Mechanismen unterliegt der Freisetzung von cfDNA und therapiespezifische Effekte sollten in der Liquid Biopsy-basierten Therapieüberwachung unter TKI-Behandlung berücksichtigt werden.