

## **Charakterisierung von Tumorzellen im Primärtumor, Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Eierstockkrebs.**

### **Welche Faktoren bestimmen die Platinresistenz?**

#### ***Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom)***

Das Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste Todesursache bei Frauen mit einer Krebserkrankung in Europa und den Vereinigten Staaten. In Deutschland erkranken jährlich ca. 9000 Frauen, und ca. 6000 Frauen sterben pro Jahr an dieser Erkrankung. Aufgrund fehlender klinischer Frühsymptome und unzureichender Screeningmethoden erfolgt die Erstdiagnose bei 75–80% der Fälle in fortgeschrittenen Stadien mit einer Fünfjahres-Überlebensrate von ca. 30%. Zu den Eckpfeilern des Therapiekonzeptes bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom gehören die möglichst radikale Erstoperation und eine Platin/Taxan haltige Chemotherapie. Mittlerweile konnten neben diesen Standardtherapien multimodale Ansätze im Sinne einer individualisierten, zielgerichteten Therapie entwickelt werden. Neben Antikörpertherapien kommen als zielgerichtete Therapien beim Ovarialkarzinom die „small molecules“ wie Sunitinib oder Sorafenib in Frage, die verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen hemmen, die mit dem Tumorwachstum, der Angiogenese und der Entwicklung von Metastasen assoziiert werden.

Trotz fortgeschrittener Behandlungsmöglichkeiten beträgt die Rückfallrate beim Ovarialkarzinom etwa 75%. Das größte Problem stellt die Platinresistenz dar, die bei 15-20% der Patientinnen auftritt. Bisher lässt sich die Platinresistenz nur retrospektiv beschreiben. Grundsätzlich werden zwei Gruppen von Patientinnen bezüglich des Rezidivs unterschieden. Die Gruppe der Platinresistenten beschreibt die Patientinnen, die innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss der Chemotherapie ein Rezidiv entwickeln. Häufig werden diese Patientinnen mit einer Monotherapie, wie z.B. Paclitaxel oder Gemcitabine, weiter behandelt. Anders stellt sich die Situation der platinresistenten Patientinnen dar, die ein Rezidiv nach mehr als sechs Monaten nach Abschluss der Chemotherapie erleiden. Hier ist es üblich, den Patientinnen eine platinhaltige Kombinationstherapie, wie Carboplatin/Gemcitabine, anzubieten. Vor kurzem wurde der Poly (ADP-RibosePolymerase1)-Inhibitor (PARP1-Inhibitor) Olaparib von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA und der European Medicines Agency (EMA) zur Therapie des Ovarialkarzinoms zugelassen. Diese Therapie wird bei Patientinnen mit Rezidiv eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms, die nachweislich eine krankheitsverursachende Mutation in BRCA1- oder BRCA2-Genen aufweisen, durchgeführt.

Der stärkste, unabhängige prognostische Faktor ist der postoperativ verbliebene Tumorrest. Studien für das Ovarialkarzinom belegen, dass bei einer Gruppe von Patientinnen trotz einer optimalen operativen Zellreduktion häufig Rezidive, meist im Sinne einer Peritonealkarzinose, aber im weiteren Verlauf auch in Form hämatogener Metastasen

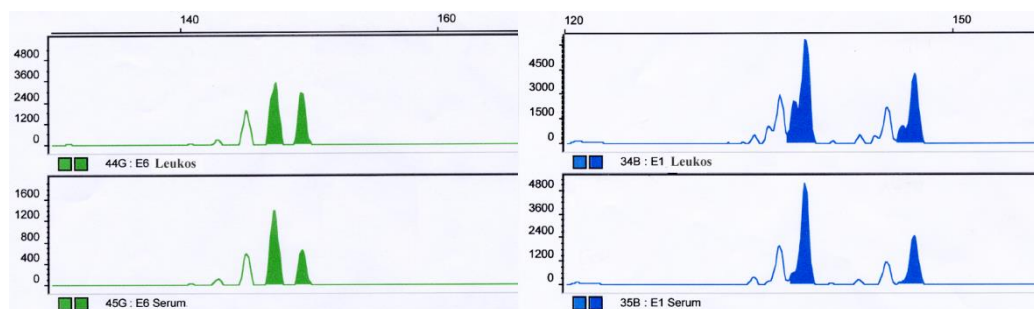
auftreten. Diese sind vermutlich auch auf die Präsenz von disseminierten Tumorzellen (**DTC**) zurückzuführen, weshalb persistierende DTC im Knochenmark (**KM**) mittlerweile auch hier als möglicher Ausgangspunkt für eine beginnende hämatogene Makrometastasierung verstanden werden. Obwohl eine Skelettmastasierung beim Ovarialkarzinom verglichen mit dem Mammakarzinom sehr selten ist, wurden DTC bei 30-47% dieser Patientinnen nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass DTC nur temporär im KM persistieren.

## **Charakterisierung von Tumorzellen im Primärtumor**

### **1. Beispiel: LOH (loss of heterozygosity) und seine Relevanz**

In der Entwicklung von Tumoren spielen genetische Veränderungen eine entscheidende Rolle, die die Funktion bestimmter Gene ausschalten („loss of function“) oder neue Funktionen („gain of function“) hervorbringen. Die LOH-Analyse ist eine spezifische Methode für die Lokalisierung des betroffenen Gens, wobei die komplexen Muster der DNA-Verluste, Verdoppelungen und Vervielfältigungen während der Tumorbildung identifiziert werden können.

#### **Analysebeispiel für LOH**



**Leukozyten- und Serum-DNA einer Patientin wurde durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet. Die rechten kleineren Peaks der Serumprobe weisen auf ein LOH hin.**

Wir untersuchten

- 1.) LOH im Primärtumor von 88 Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung an vier Eierstockkrebs-relevanten chromosomalen Loci (Apoptose, Platin-Sensitivität, DNA-Reparatur)
- 2.) die Korrelation dieser Ergebnisse mit der Präsenz und Persistenz von Tumorzellen im KM vor Operation und nach Chemotherapie sowie
- 3.) die prognostische Signifikanz der LOHs.

### **Wesentliche Ergebnisse:**

In 64% der Patientinnen zeigte sich in mindestens einem der untersuchten chromosomalen Loci ein LOH, wohingegen sich bei 36% alle vier Marker als heterozygot herausstellten.

- Die LOH Inzidenz proximal zum M6P/IGF2R Locus (Marker D6S1581) korrelierte signifikant mit der Präsenz der DTC im KM vor Operation und deren Persistenz nach Chemotherapie.
- Die globale LOH Inzidenz korrelierte signifikant mit dem Tumordifferenzierungsgrad ( $p = 0,0001$ ) und dem histologischen Subtyp ( $p = 0,004$ ). Die LOH Frequenz des Markers D10S1765 korrelierte mit dem FIGO Stadium ( $p = 0,046$ ) und dem Tumordifferenzierungsgrad ( $p = 0,050$ ), wohingegen LOH des Markers D17S855 mit der Tumordifferenzierung ( $p = 0,023$ ) und der Histologie ( $p = 0,012$ ) korrelierten.
- Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen LOH und dem progressionsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben.

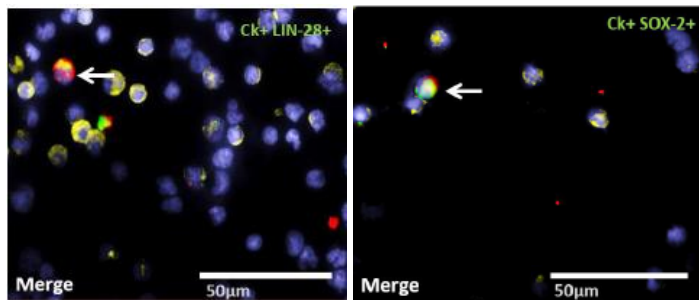
**Fazit:** LOH proximal zum M6P/IGF2R Locus ist ein potentieller Kandidat für einen neuen molekularen Biomarker, der für das Ovarialkarzinom Präsenz und Persistenz eines mikrometastatischen Phänotyps im Knochenmark voraussagen könnte (Literatur: **Kuhlmann et al., 2011**).

### **Charakterisierung von Tumorzellen im Knochenmark**

Die Detektion der DTC im KM erfolgt entsprechend der Methodik, die im Kapitel Brustkrebs beschrieben wurde.

### **Wesentliche Ergebnisse:**

- Im Rahmen der Erstdiagnose werden bei etwa 40% der Patientinnen DTC im KM gefunden.
- Patientinnen mit DTC zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hatten eine signifikant kürzere Zeit bis zum Progress der Erkrankung (PFS) und ein kürzeres Gesamtüberleben (OS) (Literatur: **Fehm et al., 2013**).
- Einige DTC überlebten auch die Platinhaltige Chemotherapie. Es handelte sich dabei um intakte Zellen, die ein Gewebsantigen des Tumors auf der Oberfläche trugen (Literatur: **Wimberger et al., 2007**).
- Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den gefundenen DTC um Tumorzellen mit Stammzellcharakter handelt, die teilweise schon zur Diagnosestellung präsent waren und sich unter Therapie vermutlich vermehrt haben (Literatur: **Chebouti et al., 2016, siehe Foto**).
- In einer Studie mit Patientinnen, die in einer fortgeschrittenen Phase der Erkrankung waren, zeigte sich, dass eine intraperitoneale Antikörpertherapie im Aszites (Tumorflüssigkeit im Leib) auch systemische Wirkung auf Zellen in der Zirkulation zeigte (Literatur: **Wimberger et al., 2009**).



Aus *Chebouti et al., 2016*

### **Charakterisierung von Tumorzellen im Blut**

Die Detektion der zirkulierenden Tumorzellen im Blut (CTC) im Blut erfolgt entsprechend der Methodik, die im Kapitel Brustkrebs beschrieben wurde. Für das Ovarialkarzinom wurden teilweise andere Genprodukte nachgewiesen.

- Patientinnen mit CTC zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hatten eine signifikant kürzeres PFS und OS (**Literatur: Aktas et al., 2011**).
- Insbesondere resistente, ERCC1pos CTC konnten als prädiktiver Marker für ein verkürztes PFS, OS sowie eine klinische Platinresistenz identifiziert werden (**Literatur: Kuhlmann et al., 2014; Chebouti et al., 2016**).
- Des Weiteren zeigte sich unter Therapie, dass CTC mit mesenchyalem Charakter dominieren und PI3Kαpos/Twistpos CTC nach Therapie als „neuer“ CTC Phänotyp präsent sind (**Literatur: Chebouti et al., 2017**).