

Prä-therapeutische ex-vivo Reparatur kinetiken von Platin-DNA-Addukten in zirkulierenden Tumorzellen als Platin-Resistenz

Ivonne Nel¹, Thomas C Gauler², Ann-Christin Nickel¹, Jürgen Thomale³, Wilfried E E Eberhardt², Martin Schuler² und Andreas-Claudius Hoffmann^{1,2}

1: Molekulare Onkologische Risikoprofil-Erforschung; Innere Klinik (Tumorforschung); Westdeutsches Tumorzentrum; Universitätsklinikum Essen, Essen
2: Innere Klinik (Tumorforschung); Westdeutsches Tumorzentrum; Universitätsklinikum Essen, Essen,
3: Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Universität Duisburg-Essen, Essen,

BACKGROUND

- Cisplatin (Cis)-Kombinationen sind Schlüsselemente der Erstlinientherapie des Lungenkarzinoms.
- Cis-induzierte DNA-Addukte korrelieren mit der Zellschädigung; Cis-Konzentration im Gewebe sind signifikant mit dem Tumoransprechen korreliert.
- Begrenzte Verfügbarkeit von Biopsiematerial besonders bei Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC).
 - Biopsiematerial = Momentaufnahme**
 - Maligne Tumoren ≠ statisches Gewebe
 - Genetische Veränderungen als Antwort auf Chemotherapie
- Zirkulierende Tumorzellen (CTC) =**
 - „Life-Bild & Liquid-Biopsie“
 - >Verlaufsbeobachtung<**
- CTC-Detektionsmethoden bestehen aus Anreicherung und anschließender Detektion
 - Selektion mittels Immunmagnetischen Beads, die mit Antikörpern gegen Tumorzelloberflächenantigene beschichtet sind, ist die derzeit ige Methode der Wahl
- Bei Epithelial-Mesenchymaler Transition (EMT) können CTC epitheliale Eigenschaften ablegen
 - > Negative Isolation = Abreicherung der hämatopoetischen Zellen

METHODOLOGY

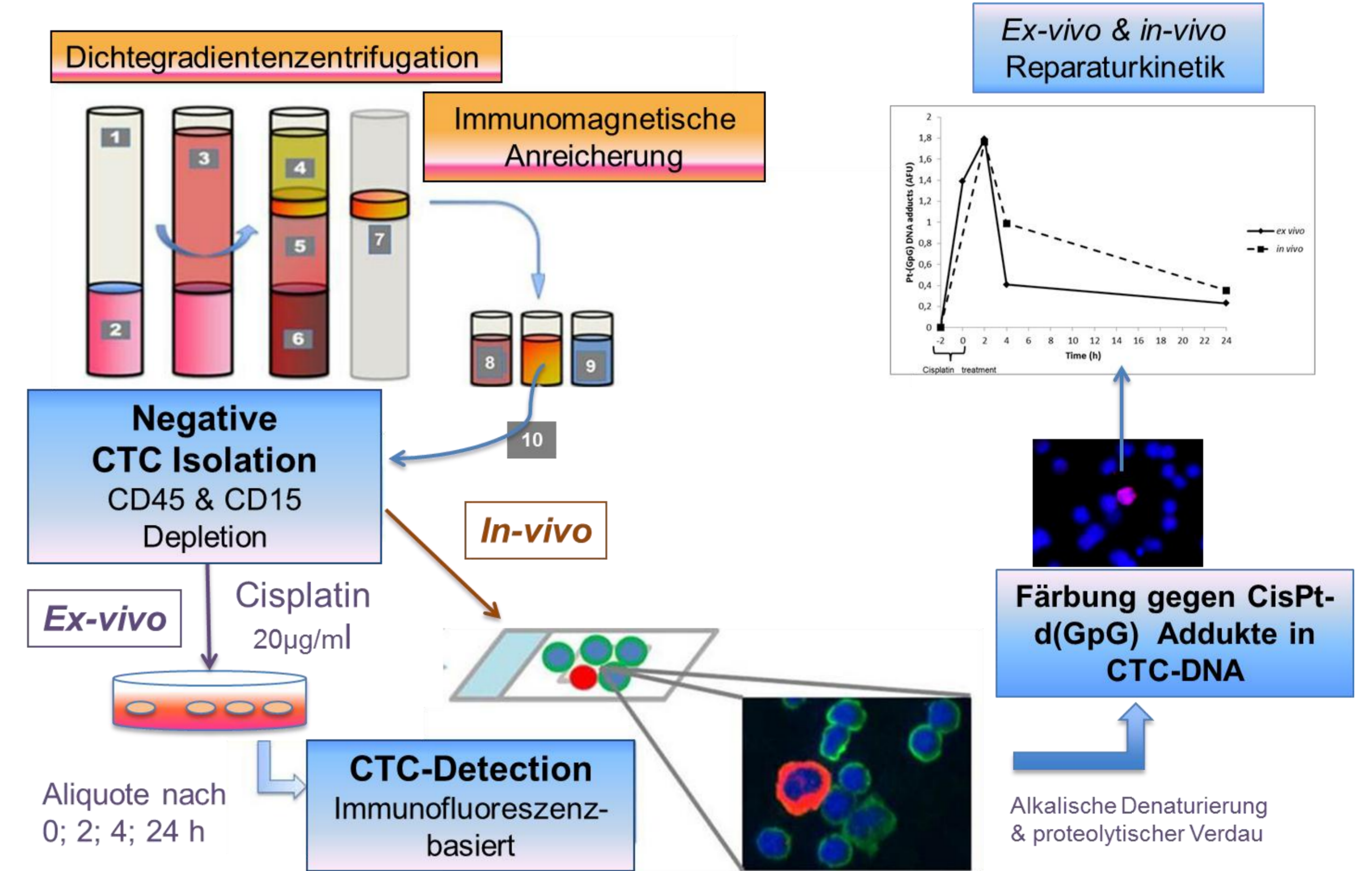


Abb. 1: Schematische Darstellung des Grundprinzips von CTC-Anreicherung und Cisplatinbehandlung. 1.Leucosep-Röhrchen; 2.Separationsmedium; 3.Vollblut/PBS-Gemisch; 4. Plasma; 5.Separationsmedium nach Zentrifugation; 6.Erythrozyten; 7.Interphase mit PBMC incl. CTC (buffy coat); 8.Anti-CD45-Beads (Position C); 9.Anti-CD15-Beads (Position A); 10.depletierte bead-freie Zellsuspension inkl. CTC für Cisplatin-Behandlung unter standardisierten Zellkulturbedingungen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung auf Adhäsionsobjektträgern.

RESULTS

CTC detection and Pt(GpG) adduct measurement using immunofluorescence

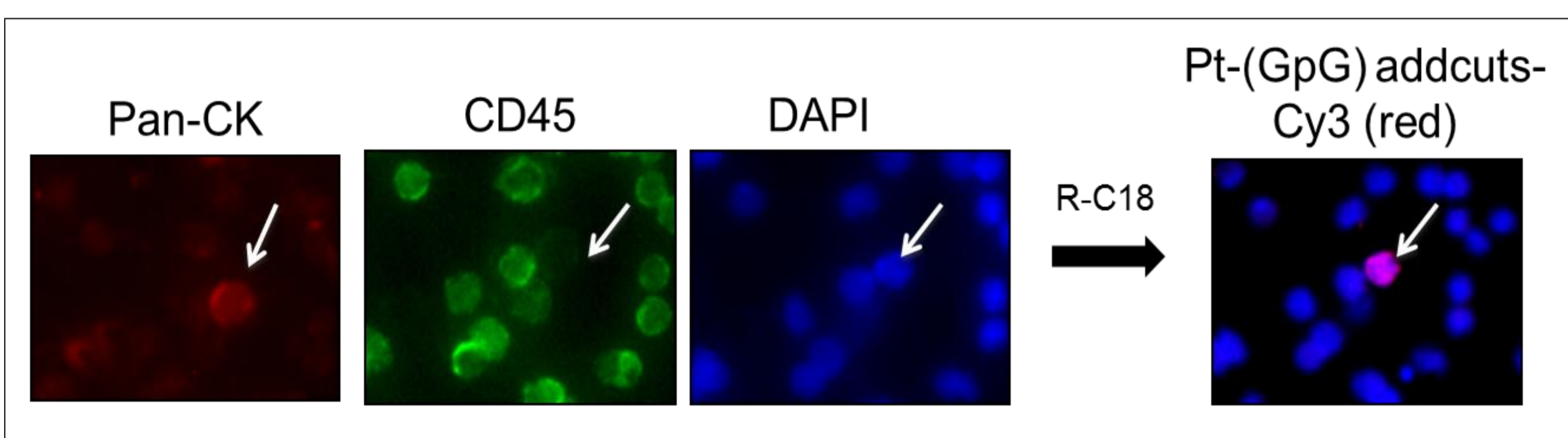


Abb. 2: Detektierte CTC wurden fotografiert und die Positionskordinaten wurden gespeichert, um ein Wiederfinden zu ermöglichen. Pt-(GpG) Intrastrang Addukte in der DNA der relokalierten CTC-Kerne wurden zu verschiedenen zeitpunkten visualisiert und mittels Immunfärbung mit dem adduktspezifischen monoklonalen Mausantikörper „R-C18“ gemessen. Diese Abb. Zeigt eine epitheliale Pan-Cytokeratin-positive/CD45-negative/DAPI-positive CTC mit. Diese Methode ist erweiterbar auf die Detektion und Vermessung von mesenchymalen und auch stammzellartigen CTC.

Pt-(GpG)-Reparaturkinetik

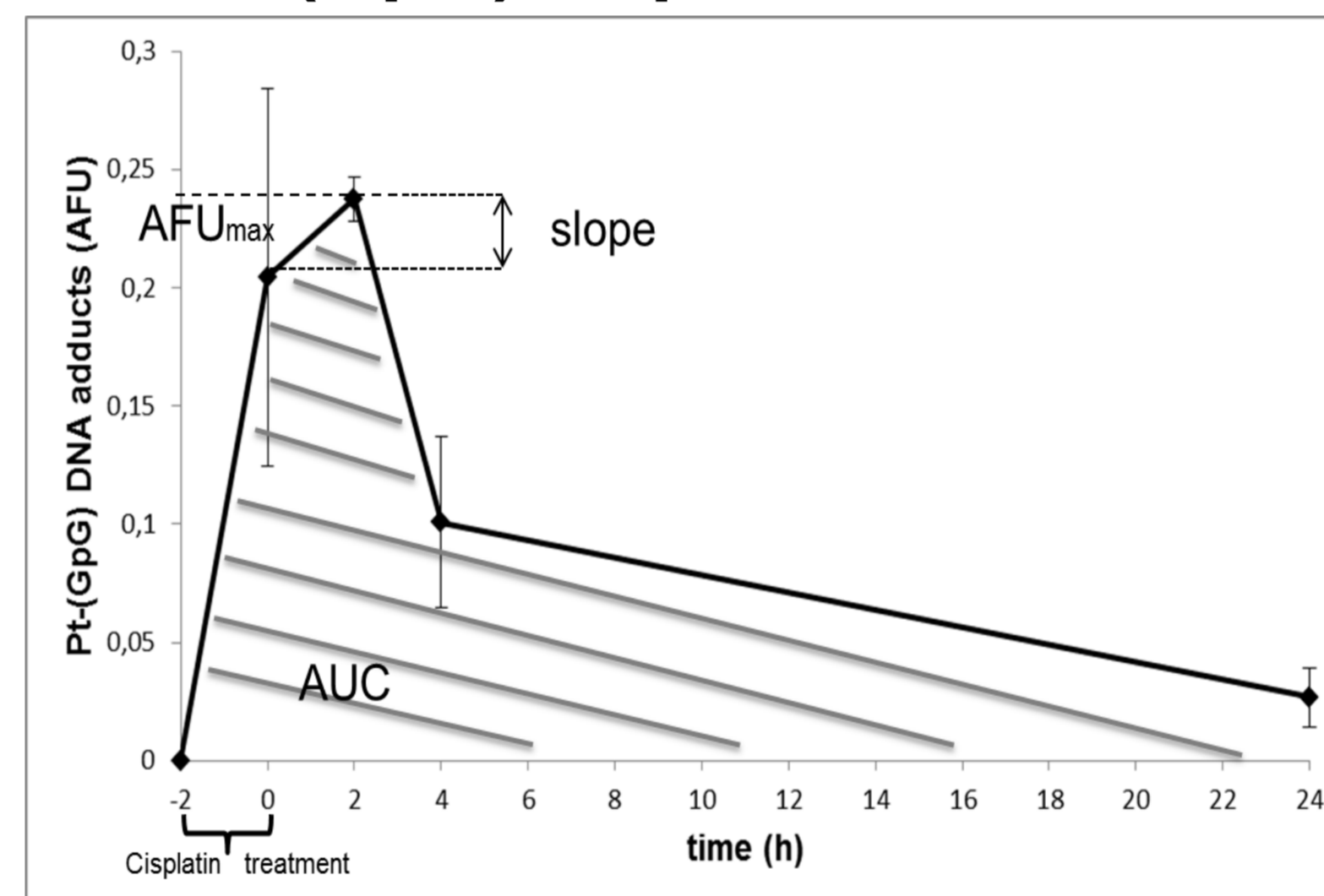


Abb. 3: Bildung und Reparatur von Pt-(GpG) in der DNA von cisplatinbehandelten CTC von NSCLC Patienten. CTC wurden mit Cisplatin (20µg/ml) für 2h inkubiert, in frisches Medium überführt und Aliquote wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0,2, 4 und 24 h) genommen. Negativkontrolle wurde vor Cisplatinbehandlung genommen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. :

Table 1. Patient demographics

Demographic	Patients (n=11)	
	No.	%
Age		
Median, years	61	
Range	50-74	
Histo		
Adenocarcinoma	7	64
Squamous epithelium	4	36
Staging		
IIIa/b	6	55
IV	5	45
Grading		
G2	4	36
G3	2	18
Gx	5	45
Therapy		
Cisplatin/Paclitaxel	7	64
Carboplatin/Paclitaxel	2	18
Cisplatin/Pemetrexed	2	18
Response		
SD	6	55
PR	5	45

Abbreviations: G2: moderately differentiated; G3: poorly differentiated; Gx: Grade cannot be assessed
SD, stable disease; PR, partial response;

Ex-vivo Kinetiken vor Cisplatin-Therapie

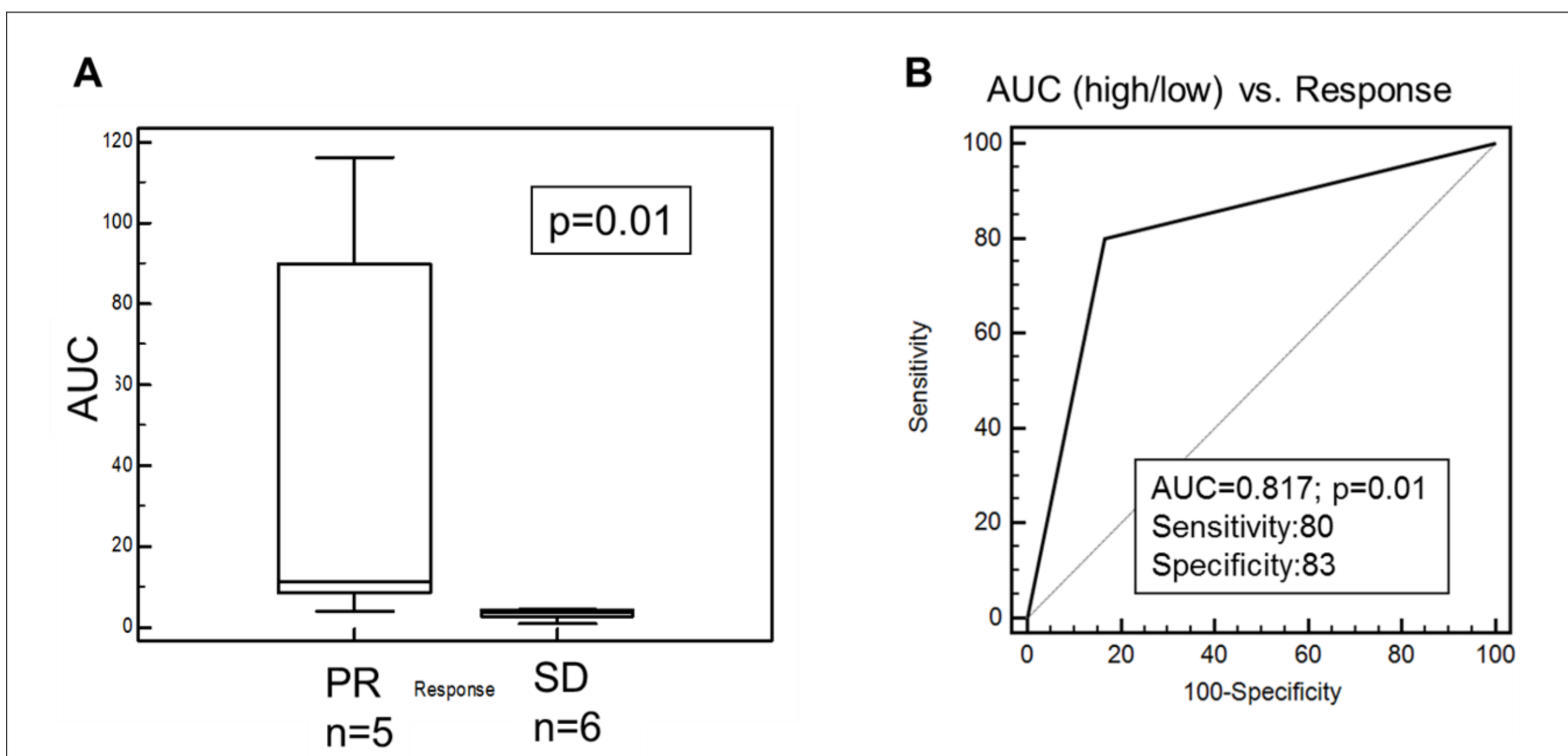


Abb. 4: **A)** Area and the Curve (AUC) der ex-vivo Reparaturkinetiken von Patienten mit partiellem Ansprechen (PR; Mittelwert:37,08) und stabiler Erkrankung (SD; Mittelwert:3,11; p=0,01; n=11). **B)** Receiver Operating Curve (ROC) Analyse zeigt die Sensitivität und Spezifität, mit der eine hohe AUC (>50te Perzentile) als Parameter der Reparaturkinetik PR von SD unterscheidet.

AUC –Anstieg über die 50te Perzentile könnte prädiktiv sein für Therapieansprechen (PR)

Ex-vivo vs in-vivo Reparaturkinetik

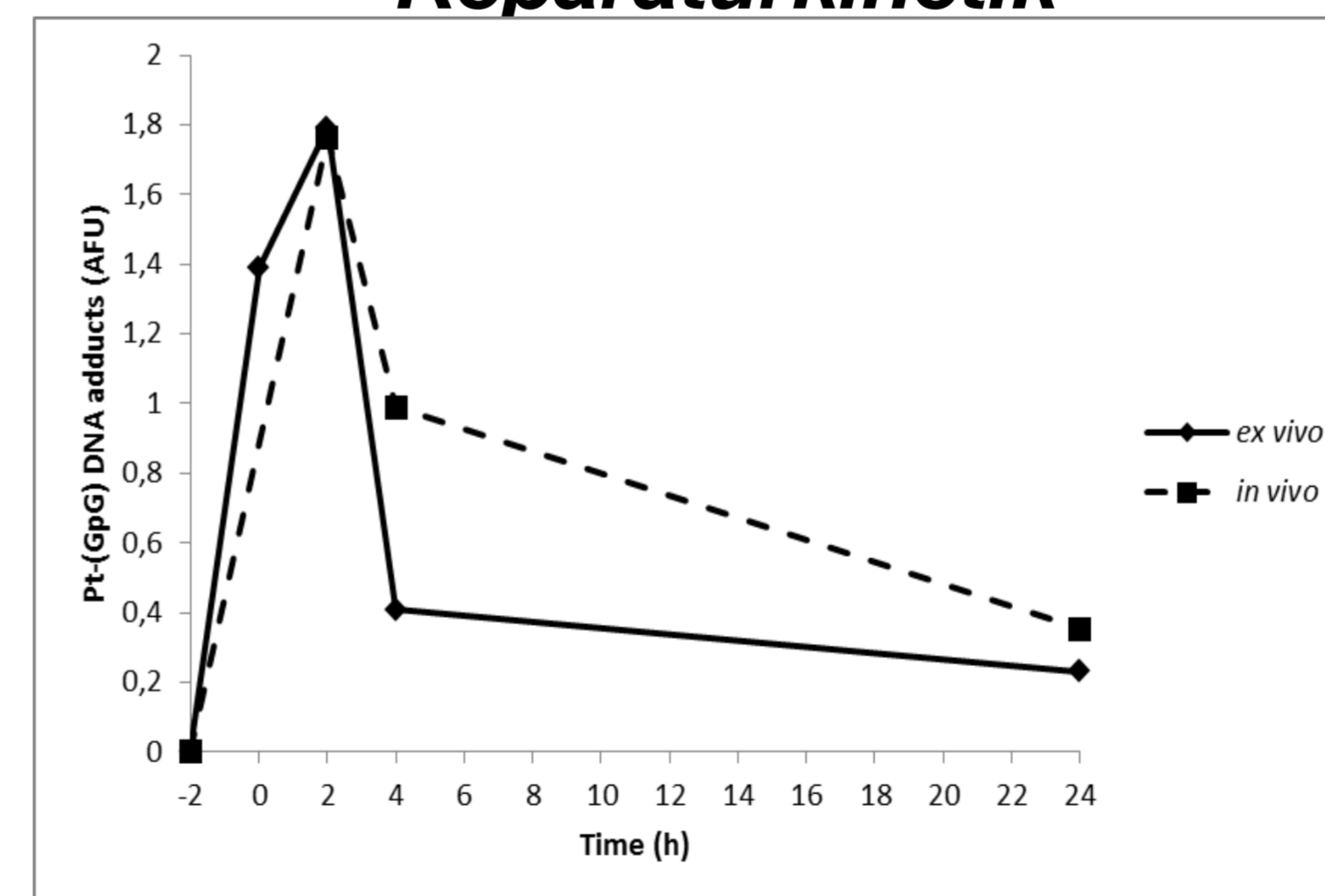


Abb. 5: Ex- und in vivo Pt-(GpG)-Reparaturkinetik des selben Patienten zeigen ähnliche Verläufe. Ex vivo Cisplatinbehandlung erfolgte unter Standardzellkulturbedingungen mit vergleichbarer Dosis. -2h bedeutet, die Probe wurde 2 Stunden vor Cisplatin-Therapie genommen. 0h bedeutet, die Proben wurden direkt nach der Cisplatinbehandlung genommen (nur möglich bei ex vivo-Behandlung). 2-24h :Proben nach der Behandlung.

ERCC1 mRNA Expression

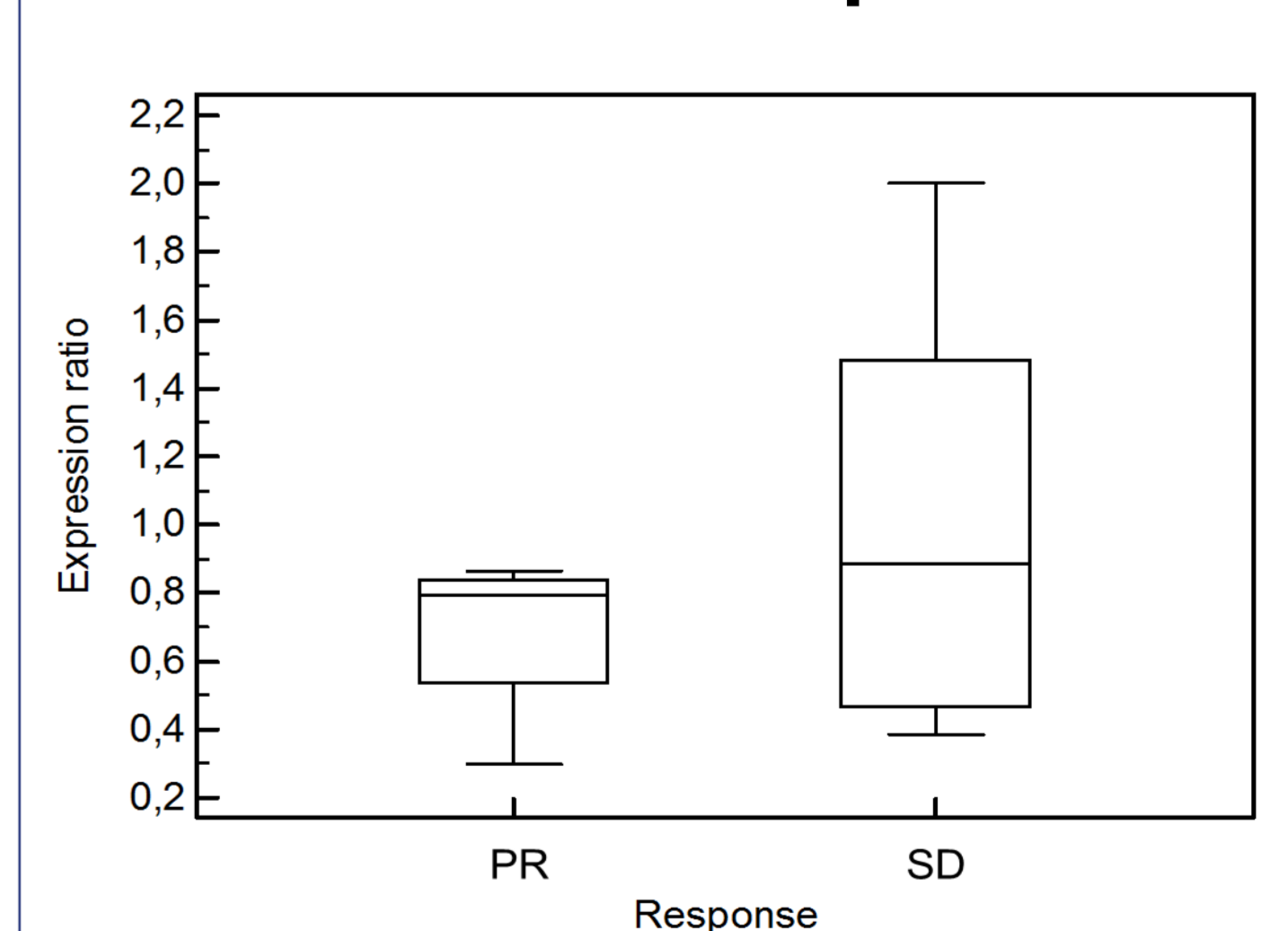


Abb. 5: ERCC1 mRNA Expression in Patienten mit partiellem Ansprechen (PR) und stabiler Erkrankung (SD) zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Ansprechen (p=0,55). Die Expressionsratio war 0.69±0.23 in Patienten mit PR und 1.02±0.58 in Patienten mit SD.

CONCLUSIONS

- Methode perspektivisch als **ex vivo prä-therapeutischer Platintest**
- Quantifizierung von Pt-(GpG) Addukten in CTC **vor und während systemischer Therapie ist technisch durchführbar** und könnte prädiktiv sein für das Ansprechen auf systemische Platin-basierte Therapie
- Vielversprechende Methode zur Entwicklung eines **pre-therapeutischen Tests**
 - CTC sind geeignet als Surrogat zur Verlaufsbeobachtung**