

Abschlussbericht

Klinische Relevanz der DNA-Schadensantwort beim ossär metastasierten Mammakarzinom unter Strahlentherapie

Mit rund 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland. Bei jeder fünften Patientin kommt es ungeachtet der guten Therapiemöglichkeiten im Krankheitsverlauf zu einer Verbreitung von Tumorzellen und der Bildung von Metastasen. Die verbreiteten Tumorzellen haben oft neue Eigenschaften im Vergleich zum Primärtumor entwickelt. In diesem Stadium ist dann eine Heilung nicht mehr möglich und die durchschnittliche Lebenserwartung reduziert sich auf etwa zwei bis maximal 10 Jahre.

In diesem von der Hamburger Krebsgesellschaft geförderten Projekt sollten daher die DNA-Schadensantwort von zirkulierenden Tumorzellen mit der DNA-Schadensantwort zirkulierender weißer Blutkörperchen derselben Patientin verglichen werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob eine begünstigende Aktivierung der DNA Schadensantwort und eine Schwäche des Erbguts zu einer verstärkten DNA Schadensantwort in zirkulierenden Tumorzellen führen und damit die Prognose verschlechtert.

1. Charakterisierung der DNA Schadensantwort und der Replikationsprozesse der CTC-Linie ITB-001 im Vergleich zu einer primären basalen und einer luminalen Tumorzelllinie nach Bestrahlung.

Bevor die DNA Schadensantwort zirkulierender Tumorzellen sowie weißer Blutkörperchen von Patientinnen untersucht wurden, erfolgte die Charakterisierung dieser an einer neuen, permanenten CTC- Zelllinie. Diese wurde aus dem Blut einer Patientin mit metastasiertem Östrogenrezeptor-positivem (ER+) Brustkrebs etabliert.

Zur Charakterisierung der Replikationsprozesse wurde der DNA Fiber Assay in der CTC-Linie ITB-001 sowie in der luminalen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 und der basalen Brustkrebs-Zelllinie MDA MB 231 durchgeführt.

Das Protokoll des DNA Fiber Assays sah sowohl eine Bestrahlung mit 6 Gy, eine Inkubation mit dem PARP-Inhibitor Olaparib sowie die kombinierte Behandlung vor und wurde mit einer unbehandelten Kontrollprobe verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine Strahlenresistenz der CTCs auf, welche durch die Hinzugabe eines PARP-Inhibitors deutlich gesenkt werden konnte (Abb. 1).

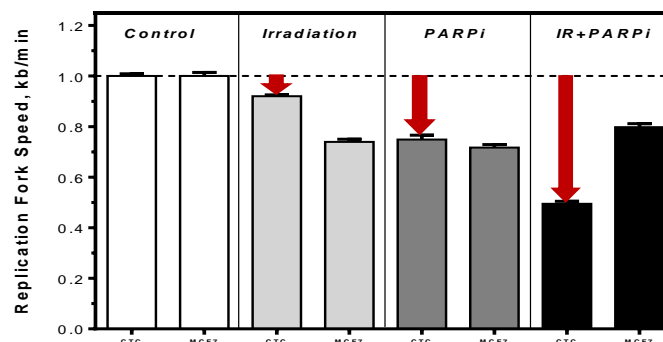
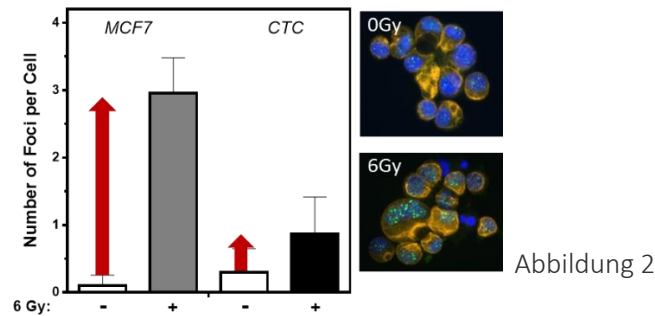


Abbildung 1

Die DNA-Schadensantwort der CTC-Linie ITB 001 im Vergleich zu den beiden Mammakarzinom-Zelllinien konnte nach erfolgreicher Etablierung geeigneter Antikörper ebenfalls mittels immunhistologischer Färbungen untersucht werden. Es zeigte sich ebenso eine höhere Strahlenresistenz der CTC-Linie im Vergleich zur Referenzlinie MCF 7 hin (Abb. 2).



Weitere immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass die CTC-Zelllinie einen sehr heterogenen Phänotyp aufweist. Sie besteht aus zwei, voneinander abhängigen Zellpopulationen, die in beiden Richtungen dynamisch miteinander interagieren können. Eine adhärente, epitheliale Population und eine fluide, oftmals in Clustern vorliegende, mit einem mesenchymalen Phänotyp. In beiden Zellpopulationen zeigt sich eine große Variation in der Zellgröße, wobei große Zellen mehrere Zellkerne aufzuweisen scheinen. Die Heterogenität der Zellen spiegelt sich auch in der Anzahl der Chromosomen wider, sie divergiert zwischen 8 – 82 und liegt im median bei 74 Chromosomen. Die CTC-Zelllinie zeigt darüber nur eine geringe Proliferationsrate (Abb. 3). Ob diese phänotypische Heterogenität auch heterogene DNA-Schadensantworten in den verschiedenen Sub-Phänotypen bedingt, muss in der Zukunft in weiteren, separaten Analyse noch untersucht werden.

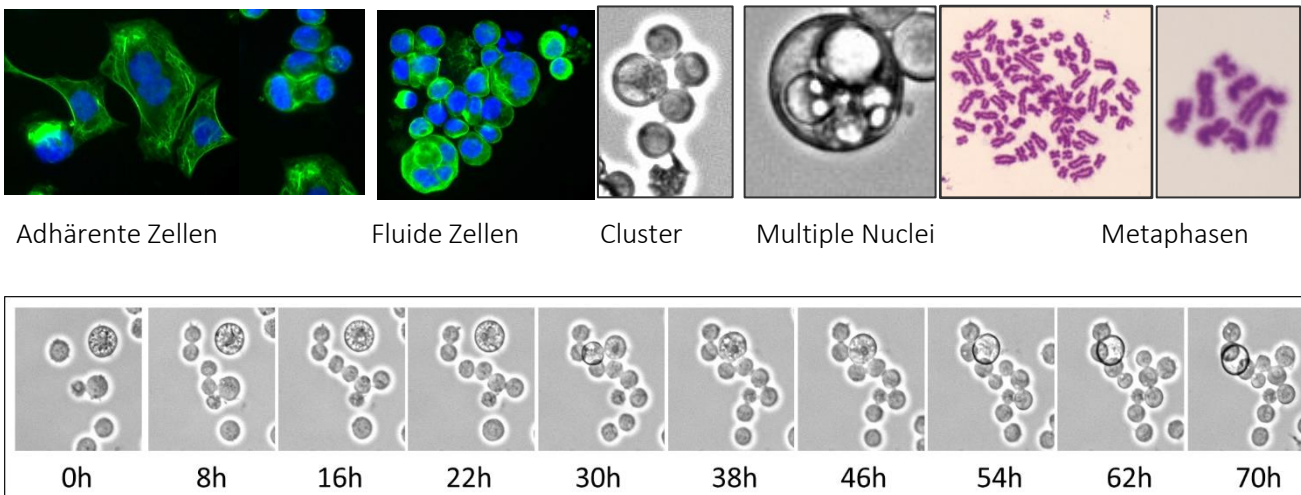


Abbildung 3: Dynamik und Proliferation eines CTC-Clusters

2. DNA-Schadensantwort und Replikationsprozesse in CTCs und in primären Lymphozyten nach ex vivo Bestrahlung von Patientinnen mit ossär metastasiertem Mammakarzinom.

In der Rekrutierungsphase von Patientinnen mit einem ossär metastasiertem Mammakarzinom konnten nur wenige Patientinnen zur Teilnahme an der Studie motiviert werden. Um das Kollektiv sinnvoll zu erweitern wurden deshalb auch Patienten/innen mit cerebral metastasiertem Mamma- oder Bronchialkarzinom mit in diese Studie

aufgenommen. Es konnten so insgesamt 80 Patienten/innen für die Studie gewonnen werden. Bei jedem/r teilnehmenden Patienten/Patientin sollte jeweils eine Blutentnahme vor der ersten und nach der letzten Bestrahlungssitzung sowie zur ersten Nachsorgeuntersuchung ca. 6-12 Wochen nach Beendigung der Strahlentherapie erfolgen. Neben der Rekrutierung stellte sich jedoch auch das angedachte Entnahme-Schema als Herausforderung dar. Es kam zu einigen Drop-outs, so dass nicht bei jedem Patienten 3 Blutproben gewonnen werden konnten.

Dank der finanziellen Hilfe der Hamburger Krebsgesellschaft konnten bei allen erfolgten Blutentnahmen die CTCs mittels CellSearch detektiert, quantifiziert und hinsichtlich des Auftretens von Apoptose untersucht werden. Bei einigen Patienten zeigte sich während und/oder zum Abschluss der Radiatio ein Anstieg der CTCs, was darauf hindeutet, dass es durch Bestrahlung tatsächlich zu einer Freisetzung von lebensfähige CTC kommen kann. Bei den meisten dieser Patienten waren die CTC-Zahlen bei der ersten Verlaufskontrolle wieder auf den Ausgangswert zurückgekehrt oder nicht mehr nachweisbar. In den meisten Patienten/innen spiegelte sich sowohl in der Anzahl als auch Lebensfähigkeit der CTCs das klinische Outcome wieder. Es zeigte sich somit, dass bereits die kombinatorische Analysen der CTC-Anzahl und -Lebensfähigkeit zu verschiedenen Zeitpunkten der Krankheit ein umfassenderes Bild der individuellen Strahlenreaktion/-resistenz geben können.

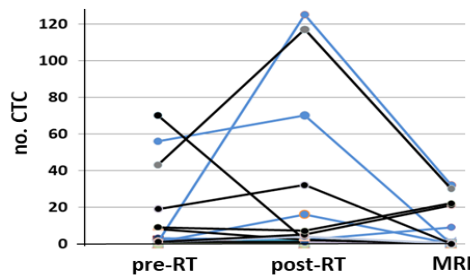


Abbildung 4: Anzahl CTCs einiger Patienten/innen während des Behandlungsverlaufes

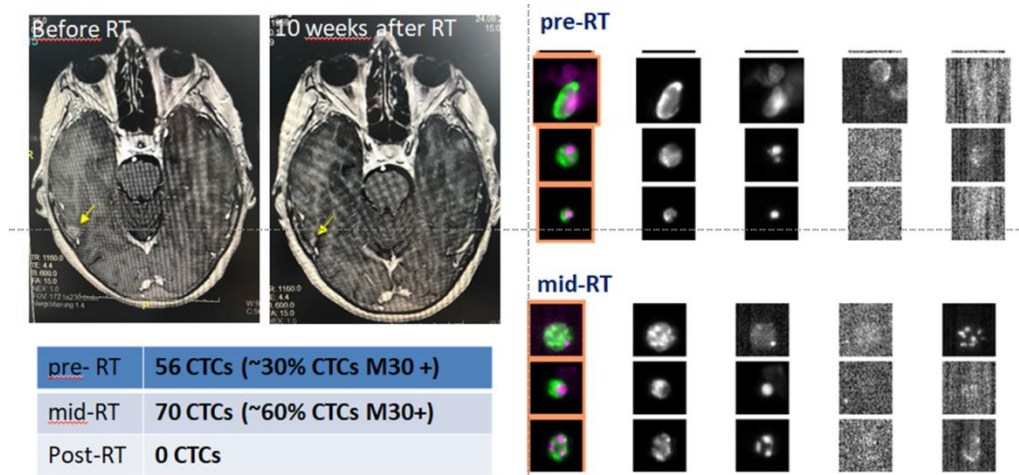


Abbildung 5: Eine MRT-Aufnahme des Gehirns einer Patientin mit oligo-metastatischer Erkrankung. 10 Wochen nach der RT wurde ein vollständiges Ansprechen aufgezeichnet.

Obwohl die CTCs direkt während der fraktioniert-stereotaktischen Radiatio anstiegen, waren die meisten Zellen geschädigt. Zum Zeitpunkt der ersten MRT-Kontrolle konnten keine CTCs mehr festgestellt werden. Die Patienten blieben 24 Monate lang rezidivfrei, wobei neue Metastasen im Hirnstamm auftraten.

Eine Publikation mit Daten aus dem Projekt ist bereits bei Embo Molecular Medicine publiziert, zwei weitere Publikationen sind in der Vorbereitung.

Yvonne Goy, Dr. med.
Ambulanzzentrum des UKE GmbH
-Fachbereich Strahlentherapie/ Radioonkologie-

Martinstraße 52
D-20246 Hamburg

Tel: +49-40-7410 53832
Mobil: +49-15222817112
e-mail: y.goy@uke.de

Kerstin Borgmann, PD Dr. rer. nat.
Labor für Strahlenbiologie & experimentelle
Radioonkologie

Martinstraße 52
D-20246 Hamburg

Tel: +49-40-7410 53596
Fax: +49-40-7410 55139
e-mail: borgmann@uke.de