

# Zirkulierende Nukleinsäuren – Spielzeug oder Werkzeug?

**Michael Fleischhacker**

[michael.fleischhacker@charite.de](mailto:michael.fleischhacker@charite.de)

**Verbesserte Behandlungsoptionen von NSCLC Patienten  $\neq$  verlängerte Überlebenszeit**

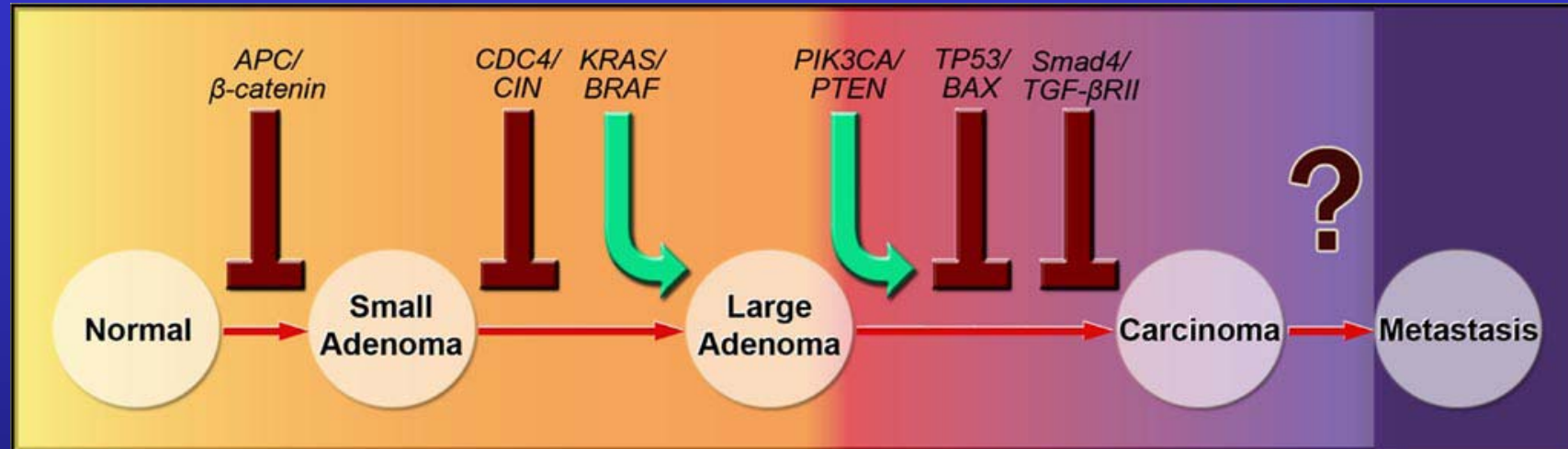
**Späte Diagnose** 

**Sensitiver und spezifischer Test zur Frühdetektion**

**Lungentumor:**

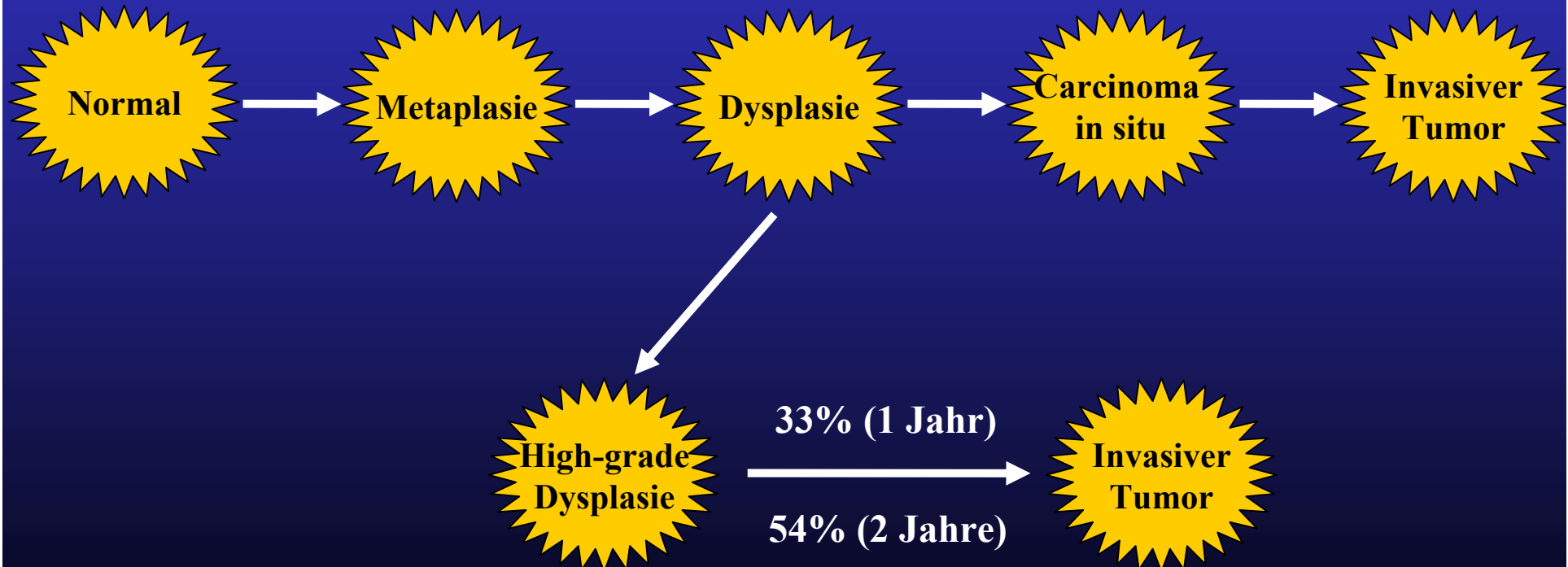
**sehr komplexe Erkrankung, viele unterschiedliche genetische Alterationen, extrem heterogen**

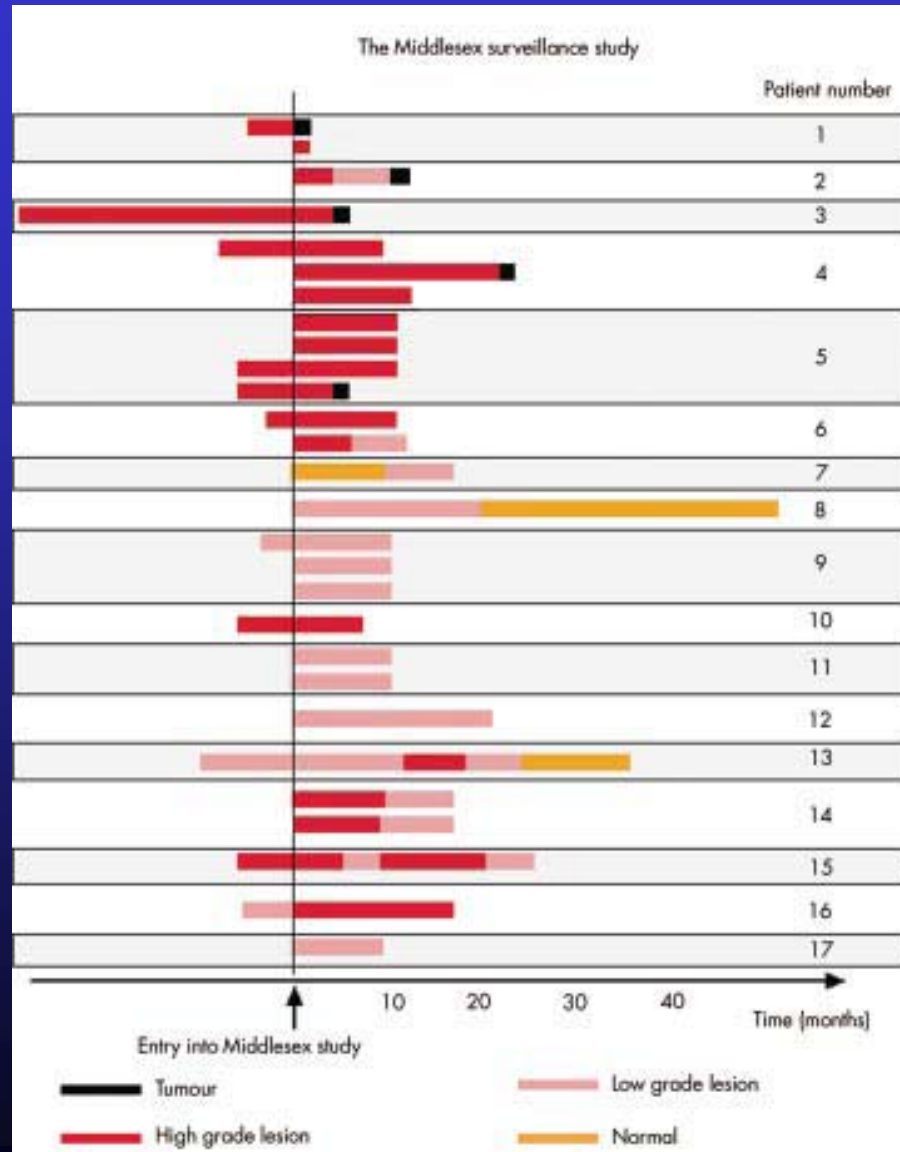
**Diagnostische Algorithmen und deren spezifische Wichtung  
Einbeziehung biochemischer, genetischer, klinischer und bildgebender Daten**



# Entwicklung eines Lungentumors

???





## Fluoreszenzbronchoskopie

17 Pat mit prä-invasive Läsionen  
Kein histologischer/radiologischer  
Nachweis einer invasiven Erkrankung

Dysplasie → Regression

High-grade Dysplasie →  
Tumor

High-grade Dysplasie →  
← Low-grade Dysplasie

**Alterationen in Tumorzellen**

**LOH (3p, 9p21, 13q14, 17p13)**

**Alterationen in prä-invasiven Läsionen**

**LOH (3p, 9p21, 13q14, 17p13)**

**Vergleichbare Alterationen in histologisch normaler Mucosa von Rauchern/Exrauchern**

**Aktueller Stand:**

**Histologie + Immunhistochemie = Säulen für Diagnose/klinische Entscheidungen**

**Jain (2007)**

**Tumormarker = jede messbare spezifische molekulare Alteration**

**Mutation**

**Amplifikation**

**Mikrosatelliteninstabilität oder Heterozygotieverlust**

**Alterationen der mitochondrialen DNA**

**alteriertes Expressionsmuster mRNA/miRNA,**

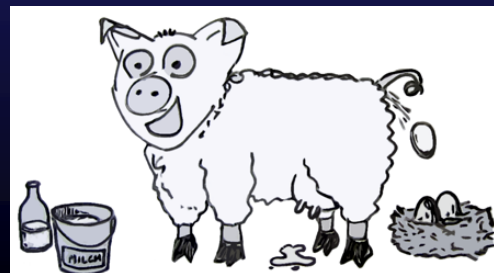
**Ideal = nützlich für Screening, Frühdetektion (Prädisposition), Prognose,**

**Therapieansprechen, Rezidiv**

**Nicht-invasiv zu gewinnen, geringe Kosten, leicht durchführbar, akkurat und**

**informativ,**

**EIER LEGENDE WOLLMILCHSAU =**



## **Geschichte**

**F. Griffith**

**The Significance of Pneumococcal Types, 1928, pp. 113–159**

**O.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty**

**Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types—Induction of transformation by a deoxyribonucleic-acid fraction isolated from pneumococcus type-III**

**J. Exp. Med. 79 (1944) 137–158**

## **Geschichte**

**P. Mandel, P. Metais**

**Les Acides Nucleiques Du Plasma Sanguin Chez L'Homme**

**CR Acad Sci Paris 1948, pp. 241–243.**

## **Definition**

**Frei-zirkulierende Nukleinsäure – Plasma und Serum, Lymphe**

**Extrazelluläre Nukleinsäuren – Körperflüssigkeiten (Liquor, Ascites, Milch, Bronchial lavage, Urin, Stuhl, zellfreie Überstände in-vitro kultivierter Zellen)**

## **Nachweis Tumor-assoziiertes Alteration im Plasma/Serum**

**Cervix**

**Colon**

**Haut**

**HNO**

**Leukämie/Lymphome**

**Leber**

**Lunge**

**Magen**

**Mamma**

**Niere**

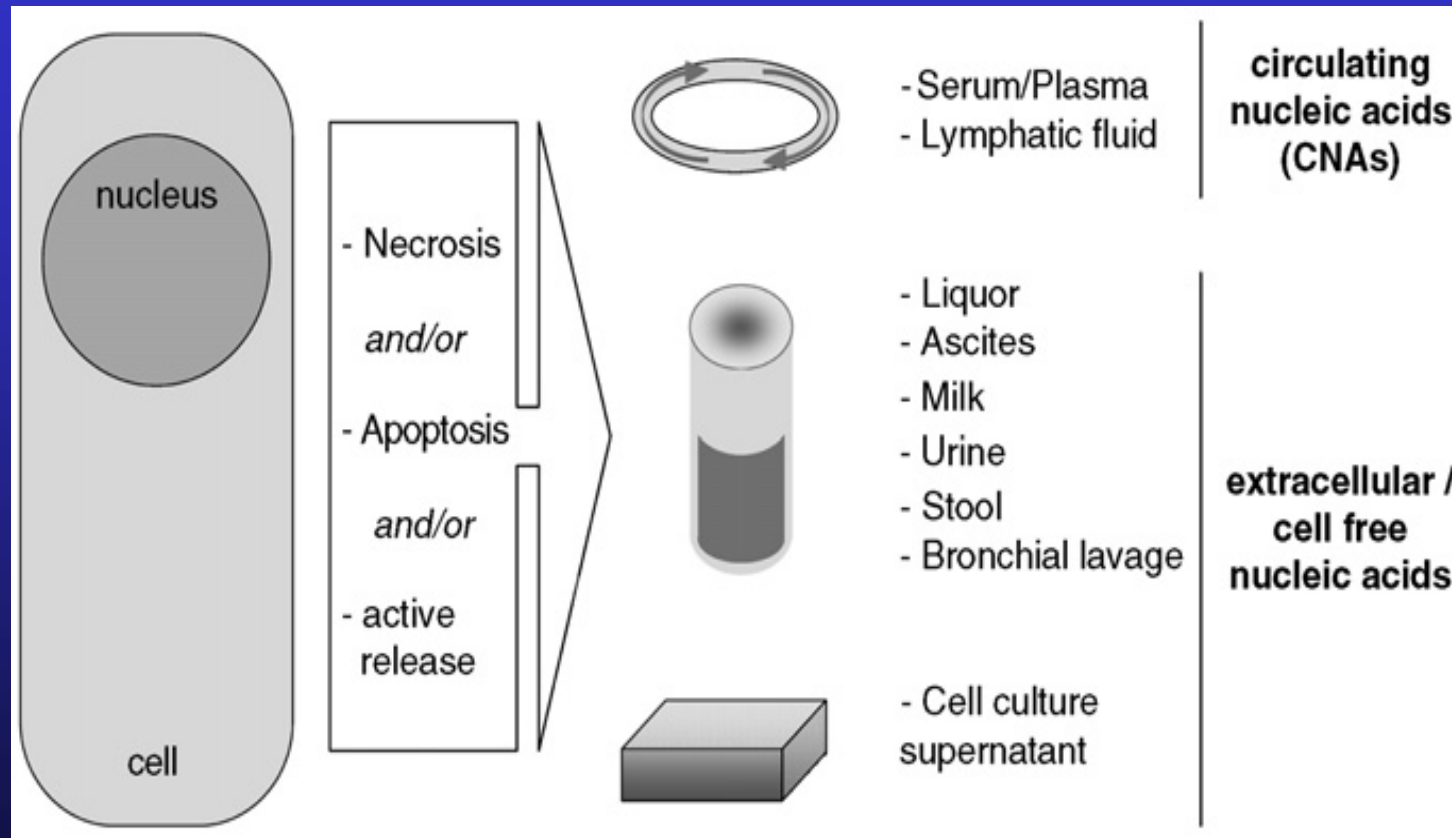
**Ösophagus**

**Ovar**

**Pankreas**

**Prostata**

**Schilddrüse**



## **Allgemeine/Technische Bemerkungen**

**Standardisierung der Probenaufbereitung**

**Verwendung kommerzieller Kits**

**Plasma vs. Serum**

## **Atemluftkondensat (EBC) zur Gewinnung zellfreier Nukleinsäuren**

**Lipidperoxidation in EBC + Plasma (Khyshiktyev et al 1994)**

**p53 Mutation in EBC von NSCLC Pat. (Gessner et al 2004)**

**Mikrosatellitenalteration ja, EGFR Mutation nein (Paradiso et al 2008)**

**Assoziation zw. # von MA und Tabakkonsum Carpagno et al. 2008**

**Assoziation zwischen Mikrosatellitenalteration + Tabakkonsum bzw. 3p**

**Alteration + Überleben (Carpagno 2009)**

## DNA Quantifizierung

**Sozzi et al. 2003**

**100 NSCLC Pat. vs. 100 matched Kontrollpat (Alter, Geschlecht, Raucherstatus)**

**Real-time PCR**

**Fläche unter ROC Kurve 0.94**  **neuer nicht-invasiver Ansatz zur Frühdetektion**

**Sozzi et al 2009**

**1035 starke Raucher, Monitoring durch jährliches CT für 5 Jahre**

**Real-time PCR (Untersuchungsbeginn + Zeitpunkt d. Tumordiagnose)**

**Plasma-DNA Konz. bei Untersuchungsbeginn in beiden Gruppen vergleichbar,  
höhere Plasma DNA Konz. assoziiert mit reduziertem 5-Jahres Überleben**

## **DNA Quantifizierung**

**Szpehcinsky et al. 2008**

**10 NSCLC Pat vor/nach Therapie, PicoGreen Färbung**

**Kein Unterschied in Plasma DNA Konz. vor/nach Therapie**

**Paci et al 2009**

**Plasma DNA Konz. in Lungentumorpat. 12.8 ng/mL vs. Gesunde**

**Kontrollgruppe (gleiches Alter + Geschlecht) 2.8 ng/mL**

**Tamkovich et al. 2008**

**Kein Unterschied in zellfreier DNA in Lungentumorpat. vs. Gesunde**

**Kontrollgruppe, Konz. von Oberflächen gebundener DNA in Tumorpat.**

**niedriger als in Kontrollen, Bedeutung???**

## DNA Quantifizierung

**Zhang et al. 2009**

**Screening von Lungentumorpat. möglich durch Quantifizierung zellfreier  
Plasma-DNA?**

**Metaanalyse, 10 paper, Cutoff 2 – 50 ng/mL,**

**Sensitivität 48% - 91%, Spezifität 47% - 100%**

## **Nachweis mutierter Onkogene/Tumorsuppressorgene**

**K-ras**                      **Colon, Mamma, SCLC, Pankreas**

**p53**                        **Ovar, GI, NSCLC, Leber**

**APC**                        **Colon**

**BRAF**                      **Melanom**

## **Onkogene**

**> 100 Onkogene bekannt**

**Beteiligung an Cancerogenese der Lunge: ras, c-myc, tyrosin-kinase rezeptor (EGFR), c-erb-B2 (Her-2/neu)**

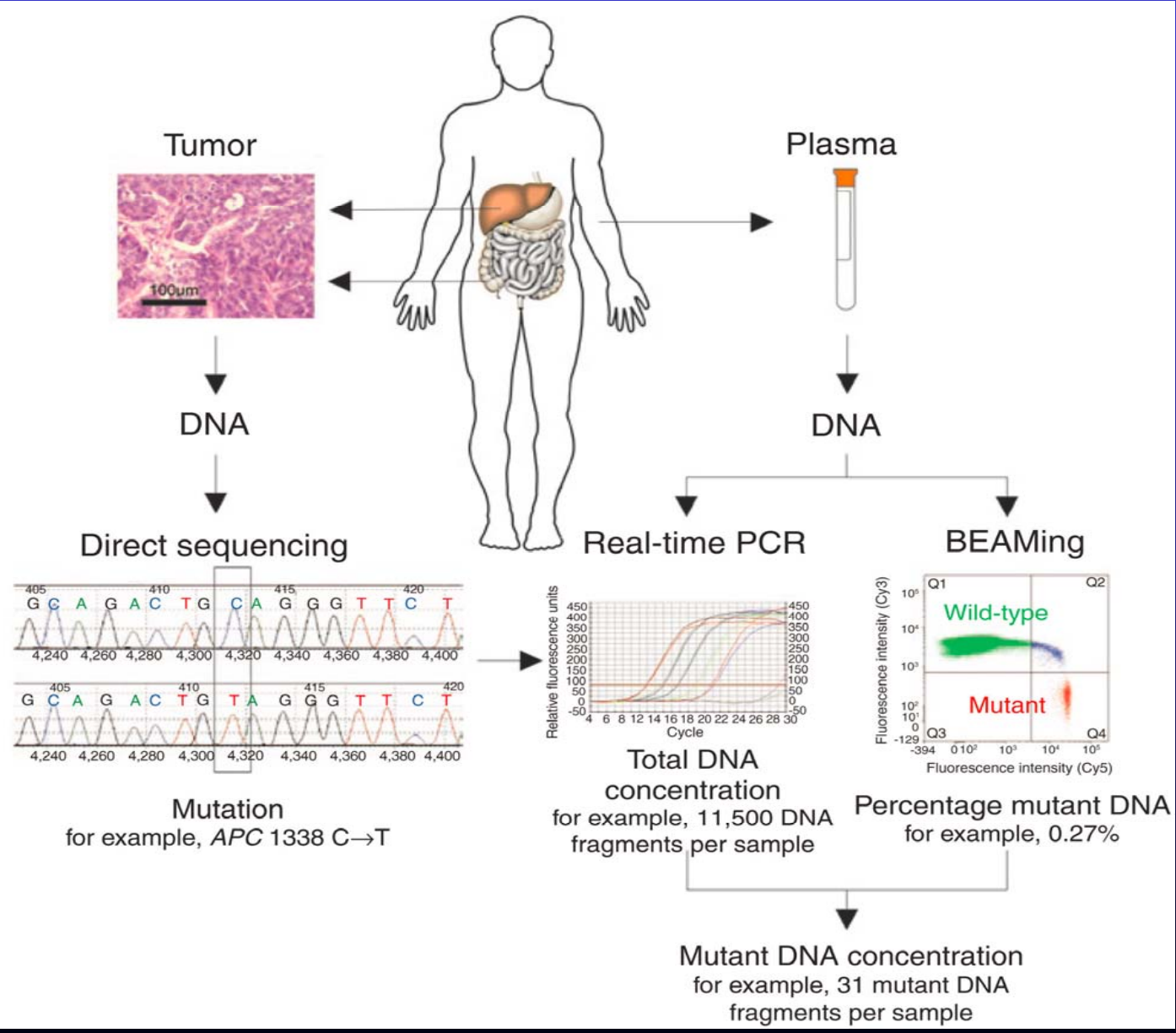
**Castells et al. 1999**

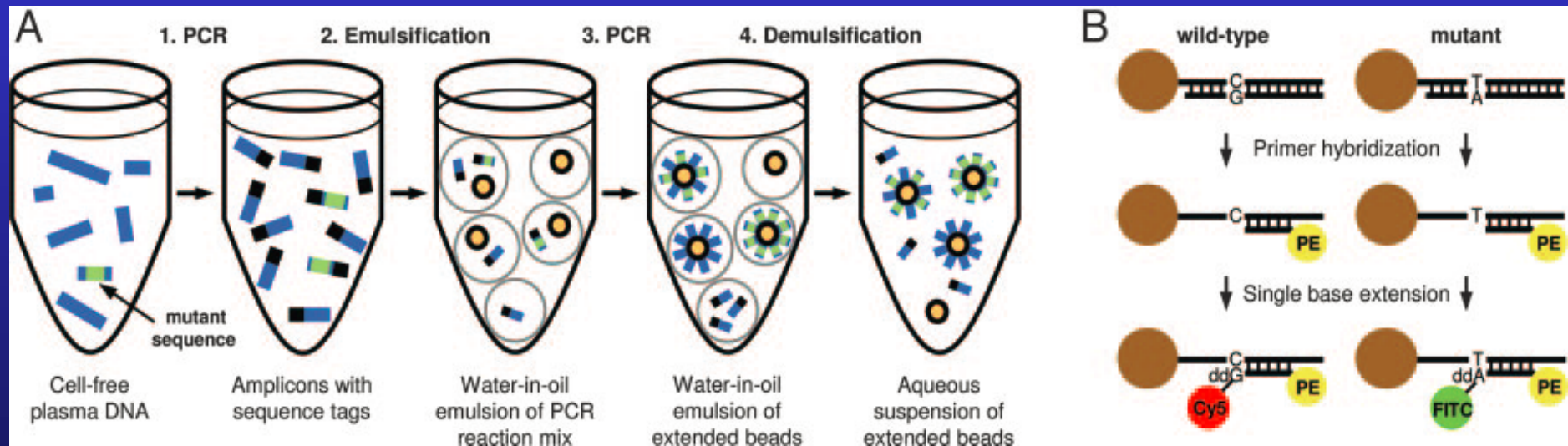
**Nachweis K-ras Mutation in zellfreier DNA = diagn. + progn. Signifikanz**

**Pao et al. 2005**

**Prognostische Bedeutung K-ras Mutation in Adeno-Ca??**

**Leicht reduziertes Überleben von Pat. mit K-ras Mut.**





**Ursache für diskordante Ergebnisse**

**verwendete Detektionsmethode**

**Detektion im Tumor vs. Plasma**

## Onkogene

**Camps et al. 2005**

**Prognostische Bedeutung von K-ras Mutationen im Serum von NSCLC Pat.**

**Kein signifikanter Unterschied,**

**Pat. mit K-ras Mutation = 7.3 Monate progression-free survival**

**Pat. mit K-ras WT = 5.5 Monate progression-free survival**

**Gautschi et al. 2007**

**K-ras Mutation im Plasma, 180 NSCLC Pat.**

**Pat. mit K-ras Mutation = schlechtere Prognose**

**Wang et al. 2010**

**273 NSCLC Pat.**

**Gewebe 30 K-ras Mutationen (11%), davon 23 im Plasma nachweisbar (77%)**

**Plasma 35 K-ras Mutationen (12.8%), davon 23 im Plasma nachweisbar (66%)**

**120 Pat. Second line EGFR-TKI Therapie,**

**Response K-ras Mutation in Plasma (5.3%) und Gewebe (7.15)**

**K-ras WT in Plasma (29.7%) und Gewebe (28.3%)**

**vergleichbare % Proportionen für Progressionsfreies Überleben**

**Nicht aufgeschlüsselt Pat. mit diskordanten Ergebnissen in Mutationsanalyse**

**4.4% Mut. nur im Plasma, 2.6% Mut. nur im Gewebe nachweisbar**

## **EGFR in NSCLC Pat**

**Lynch et al. 2004,**

**8/9 NSCLC Pat. mit Mutation in Tyrosinkinase Domäne von EGFR  
sprachen auf Gefinitib an, 7 Pat. mit WT Gen = kein Ansprechen**

**Paez et al. 2004**

**EGFR Mutation in Lungentumoren = Ansprechen auf Gefinitib  
(EGFR Kinaseinhibitor)**

## **EGFR in NSCLC Pat**

**Detektion von EGFR Mutation auch im Plasma möglich?**

**Kimura et al 2007**

**42 NSCLC Pat.**

**8 Tumorproben EGFR Mut., 7 Serumproben EGFR Mut., 39/42**

**gepaarte Proben identisch (92%),**

**Progressionsfreies Überleben signifikant länger in Pat. mit EGFR Mut.**

**(Nachweis im Tumor oder Serum)**

## **EGFR und K-ras in NSCLC Pat**

**Linardou et al. 2008**

**Metaanalyse von NSCLC Pat. mit K-ras Mutation**

**Nachweis von K-ras Mutation = kein Ansprechen auf TKI (anti-EGFR monoklonaler Ab)**

## **EGFR in NSCLC Pat**

**Detektion von EGFR Mutation auch im Plasma möglich?**

**Moran et al 2007**

**112 NSCLC Pat.**

**Ansprechen auf Therapie 20% der Pat. mit EGFR Mutation in  
Tumor + Serum**

**4% der Pat. mit EGFR Mutation nur im  
Tumor**

## **EGFR in NSCLC Pat**

**Detektion von EGFR Mutation auch im Plasma möglich?**

**Bai et al. 2009**

**230 NSCLC Pat.**

**Nachweis EGFR Mutation in Tumor + Plasma**

**80% Konkordanz**

**Yung et al. 2009**

**Quantitativer Nachweis EGFR Mutation in Tumor + Plasma**

**Menge an mutierter EGFR DNA im Plasma korrelierte mit klin. Ansprechen**

**Persistenz von EGFR Mut. im Plasma = Tumorprogression**

## **Mikrosatellitenalterationen**

**Kurze repetitive und hochpolymorphe Sequenzen, 1-6 Nukleotide (AAAAAA<sub>n</sub>, CACACA<sub>n</sub>, GATGATGAT<sub>n</sub>) mehrere Tausend im humanen Genom, Majorität in nicht-kodierenden Bereichen,**

**Chen et al. 1996**

**Sanchez-Cespedes et al. 1998**

**Sozzi et al. 1998**

**Bruhn et al. 2000**

**Conzalez et al. 2000**

**Cuda et al. 2000**

**Sozzi et al. 2001**

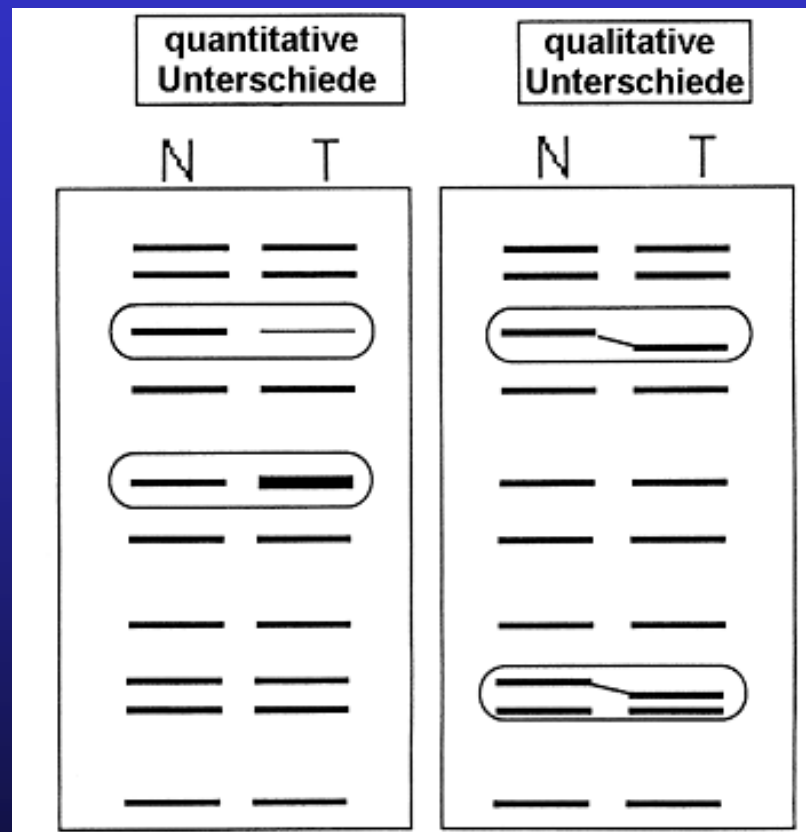
**Beau-Faller et al. 2003, 2003a**

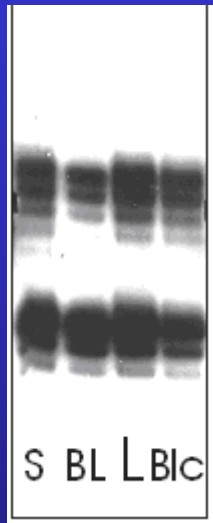
**Andriani et al. 2004**

**Schmidt et al. 2004**

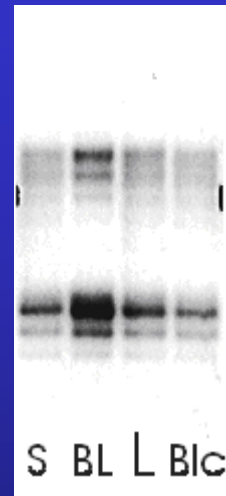
**Ludovini et al. 2008**



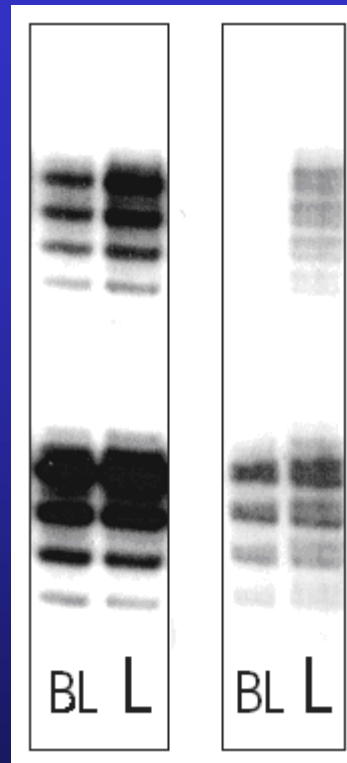




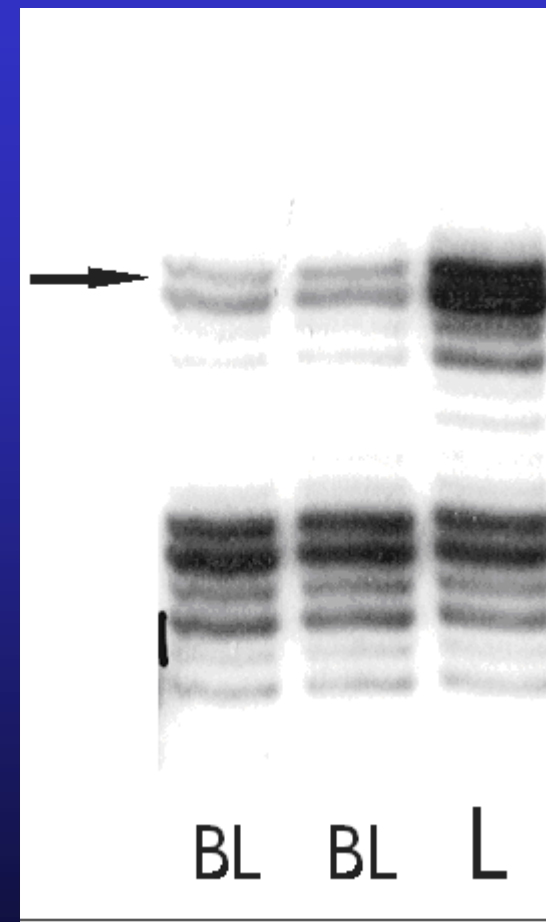
**D9S171**



**D9S171**



**D9S942**

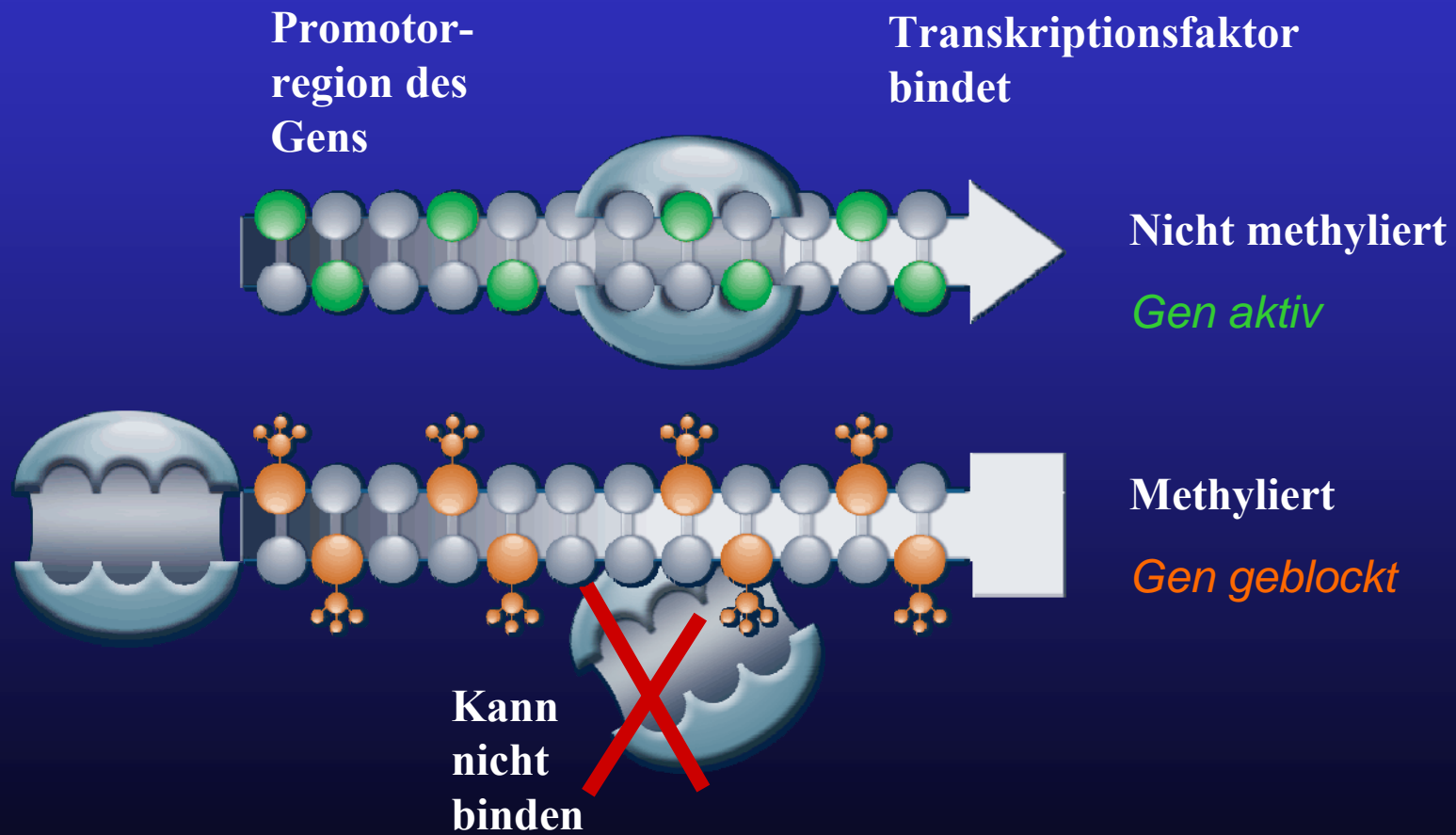


**D3S1300**

## **Mikrosatellitenalterationen**

**Ludovini et al. 2008**

## Epigenetische Alterationen



## Epigenetische Veränderungen

**Hypermethylierung regulativer Bereiche von Tumorsuppressorgenen**



**Inaktivierung dieser Gene**

**CAVE: Hypermethylierung ebenfalls im Bronchialsystem von Rauchern nachweisbar**

**Hypermethylierung vieler Gene evtl. klinisches Korrelat zu erhöhtem Risiko für Lungen-Ca,**

**Nachweis aberanter Methylierung von p16 und MGMT in Sputum 3 Jahre vor klinischer Diagnose eines Plattenepithel-Ca möglich (Palmisano et al. 2000),**

## **Epigenetische Veränderungen**

**10 Paper zum Nachweis epigenetischer Alterationen im Plasma/Serum, Sputum oder BL in Pat. mit benignen/malignen Lungenerkrankungen**

**1 bis 10 untersuchte Gene**

**p16INK4a, MGMT, RASSF1, DAPK, GSTP1, RAR $\beta$ , TMS1, APC, 14-3-3 $\sigma$ , FHIT, p14ARF, E-cadherin, etc.**

**Anzahl positiver Plasma/Serum/Sputum/BL Proben zwischen 4% und 75%  
(einzelne Marker)**

## **RNA Analysen**

**Kopreski et al. 2001**

**5T4, qualitative seminested RT-PCR**

**Plasma 6/14 Lungentumorpat. positiv**

**Fleischhacker et al. 2001**

**Her1/neu, hnRNP-B1, qualitative RT-PCR**

**Schmidt et al. 2004**

**8 Gene, qualitative RT-PCR**

**12% bis 100% pos. Plasmaproben von 25 Lungentumorpat.**

## RNA Analysen

**Sueoka et al. 2005**

**hn RNP B1, quantitative real-time PCR**

**1 pg/g mRNA vs. 0.3 pg/g RNA (Tumor vs. benigne Lungenerkrankung)**

**Überexpression auch in Plasma von Pat. mit anderen soliden Tumoren  
nachweisbar,**

## **RNA Analysen**

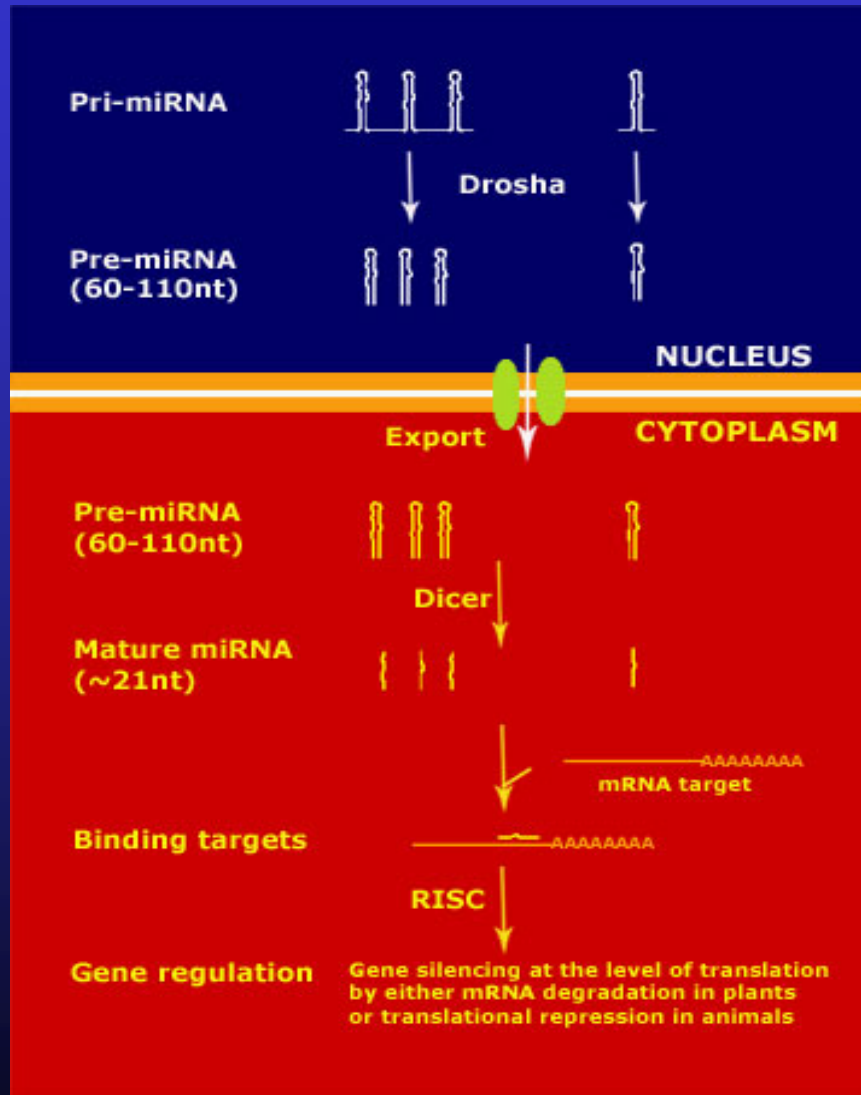
### **micro-RNA (miRNA)**

**Kleine (18-25 Nukleotide) nicht-kodierende RNA Moleküle**

**Teilweise doppelsträngig, viel stabiler als mRNA**

**Genregulation in allen wichtigen zellulären Stoffwechselwegen**

**wirken als Onkogene und/oder Tumorsuppressorgene**



## **Biologische Bedeutung zirkulierender Nukleinsäuren?**

Kim et al. 2009

Bisher: Zellen des Primärtumors → Metastasenbildung (unidirektional)

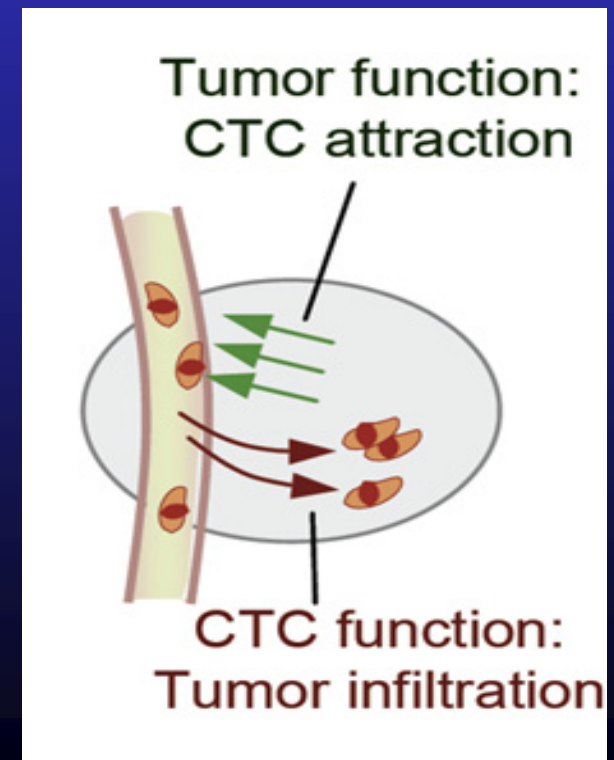
Jetzt: Zellen des Primärtumors → Metastasenbildung +  
zirkulierende Tumorzellen → Re-Kolonisierung des Primärtumors

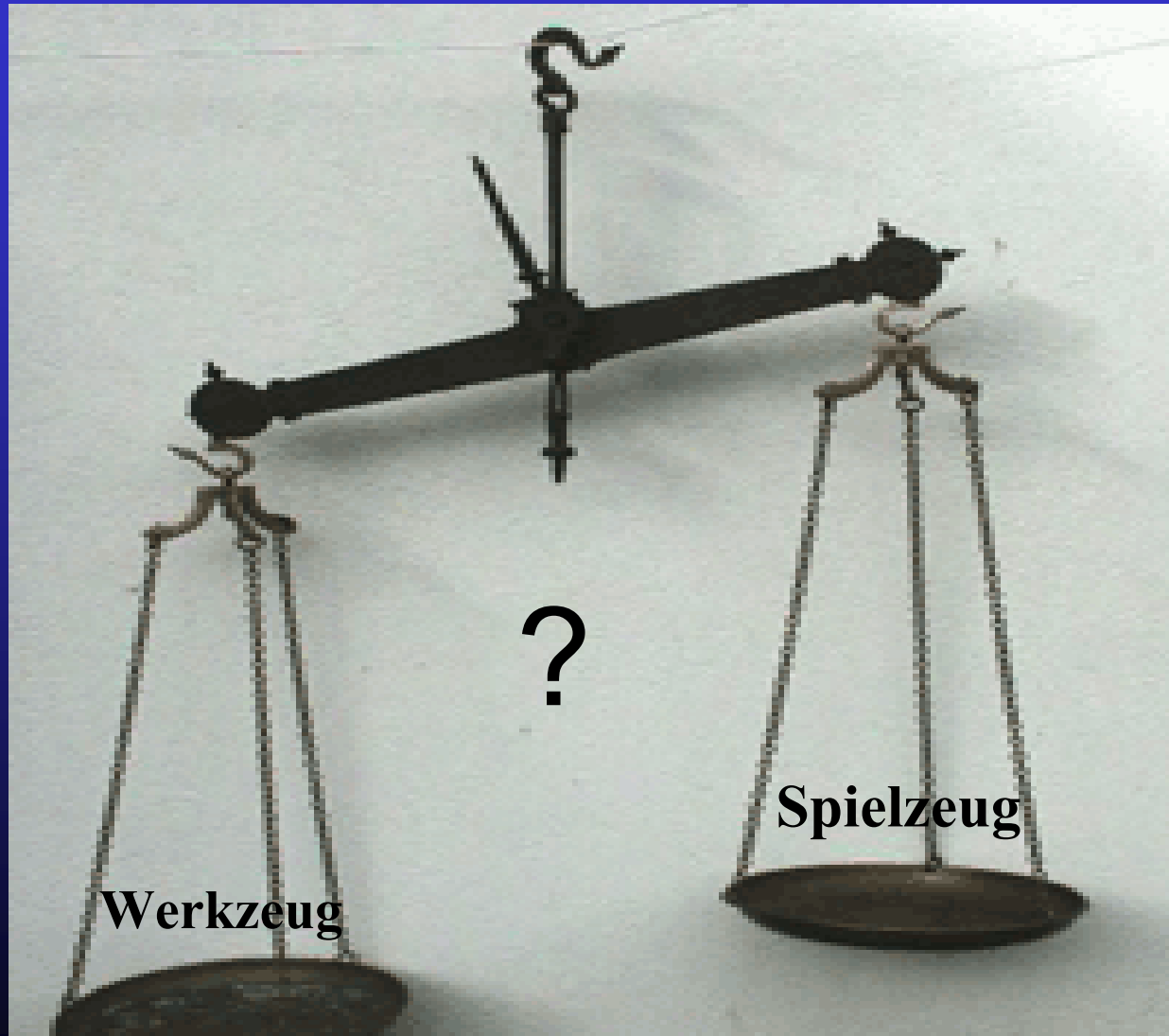
Mamma  
Colon  
Melanom

Aggressive CTC (Tropismus für Knochen- Lungen-  
und ZNS-Metastasen)



Beschleunigung des Tumorwachstums, Angiogenese  
und Stroma-Rekrutierung





**Werkzeug**

**Spielzeug**

**Vielen Dank für Ihre  
Aufmerksamkeit**

