

Abschlussbericht:

Für die Hamburger Krebsgesellschaft e.V.

Stipendiat:

Benedikt Markmann

Isebekstraße 14

22769 Hamburg

Telefon: +4915165135089

E-Mail: benedikt.markmann@outlook.de

Titel: Peripherer und portalvenöser *KRAS*-ctDNA-Nachweis als unabhängige prognostische Marker für ein frühes Tumorrezidiv beim duktalem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse

Projektdauer

Beginn: 01/10/2020

Projektdauer: 12 Monate

Ende: 01/10/2021

Abschlussbericht:

Das duktale Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (PDAC) ist die vierthäufigste krebbedingte Todesursache in der Europäischen Union. Aufgrund unspezifischer oder fehlender Symptome wird das PDAC in mehr als 80 % der Fälle in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert; die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate liegt bei ca. 10 %.

Auch bei Patienten, die in einem frühen Krankheitsstadium reseziert werden, liegt die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate (OS) unter 40 %, was die hohe Inzidenz versteckter Metastasen widerspiegelt - ein Hauptfaktor für die schlechte Prognose in einer potenziell kurativen Situation. Biomarker, die als Surrogat für versteckte Metastasen dienen, werden benötigt, um die Auswahl der Patienten zu verbessern, die trotz frühem Krankheitsstadium und anatomischer Resektabilität am ehesten von einer neoadjuvanten Chemotherapeutischen Behandlung profitieren werden.

Die Suche nach zusätzlichen kosteneffizienten und zuverlässigen Biomarkern zur Identifizierung von Patienten, die zwar anatomisch resektabel sind, aber aufgrund des hohen Risikos einer versteckten Metastasierung trotzdem eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten sollten, ist für eine bessere Behandlung dieser Patienten sehr wichtig.

Zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) könnte die Identifizierung von diesen Grenzfall-PDAC-Patienten verbessern. Die Liquid-Biopsy, die Analyse von tumorbezogenem Material im Blut und anderen Körperflüssigkeiten des Patienten, ist eine neuartige, minimalinvasive Strategie zur Diagnose von Krebspatienten und zur Überwachung des Krankheitsverlaufs.

Zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA) wird sowohl von gesunden als auch von Krebszellen, die Apoptose und Nekrose durchlaufen, in die Blutbahn abgegeben. Der Anteil der cfDNA, der von Tumorzellen freigesetzt wird, die ctDNA, macht bei Tumorpatienten nur einen kleinen Prozentsatz von etwa 0,01 %-5 % der gesamten cfDNA aus. Daher sind empfindliche Nachweismethoden erforderlich, um kleine Mengen an ctDNA nachzuweisen. Die digital droplet-PCR (ddPCR) hat sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Genauigkeit zu einer der am weitesten verbreiteten Methoden für den Nachweis kleiner Mengen von Tumor-DNA entwickelt. Um ctDNA von cfDNA zu unterscheiden, muss man auf spezifische Mutationen im Tumor abzielen. *KRAS* ist eine der ersten Mutationen, die in der Kanzerogenese des PDAC auftreten und ist bei etwa 80-90 % der PDAC-Patienten mutiert. Die Mutationen konzentrieren sich auf einige wenige "Mutations-Hotspots" an den Codons 12 und 61, was es zu einem idealen Ziel für ddPCR-basierte Nachweisverfahren macht. Der *KRAS*-basierte Mutationsnachweis wurde in mehreren ctDNA-Studien bei PDAC mit prognostischer Relevanz eingesetzt. Die ctDNA-Technologie hat ein großes Potenzial zur Optimierung der individualisierten Therapie bei PDAC-Patienten, muss aber ihren klinischen Wert noch unter Beweis stellen, um schließlich in die tägliche klinische Routine umgesetzt zu werden.

Im Rahmen dieses Projekts haben wir von 108 Patienten, die am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf aufgrund eines PDAC operiert wurde, vor und nach der Operation aus peripheren Venen, sowie intraoperativ aus der Pfortader, dem tumor-drainierendem Gefäß, Blut (n=221) abgenommen. Aus diesem Blut wurde die cfDNA extrahiert und mithilfe der ddPCR-Technologie auf *KRAS*-mutierte ctDNA untersucht um den Wert von tumornahem Pfortader-Blut als neuartige Quelle für Liquid-Biopsy-Material zu untersuchen. Das Vorhandensein von ctDNA und die Anzahl der mutierten *KRAS*-Kopien wurden für Überlebensanalysen verwendet, um die Hypothese zu testen, dass ctDNA ein Biomarker für eine schlechte Prognose ist. Es wurde besonderes Augenmerk daraufgelegt ob mithilfe von ctDNA Patienten mit hohem Risiko eines frühen Rückfalls nach der Operation, die von einer neoadjuvanten Behandlung profitieren könnten, identifiziert werden können.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Signifikant höhere *KRAS*-Mutationsnachweisraten und Anzahl von mutierten *KRAS*-Kopien wurden im Blut von palliativ behandelten Patienten im Vergleich zum Blut von kurativ behandelten Patienten beobachtet (58,1 % vs. 24,6 %; $p=0,002$; und $p<0,001$). Die Anzahl an gemessenen mutierten *KRAS*-Genkopien war im Pfortader-Blut signifikant höher als in den peripher entnommenen Blutproben ($p<0,05$). Der Nachweis von *KRAS* im prä- und postoperativen Blut und im Pfortader-Blut war signifikant mit einem kürzeren rezidiv-freien Überleben verbunden (alle $p<0,015$) und wurde als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert. Der *KRAS*-ctDNA-Status war auch ein unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor für ein kürzeres Gesamtüberleben sowohl in der palliativen als auch in der kurativen Kohorte (HR:4,9, $P=0,011$; HR:6,9, $P=0,008$).

Schlussfolgerungen:

Der Nachweis von *KRAS*-ctDNA ist ein unabhängiger negativer Prognosemarker bei kurativen und palliativen PDAC-Patienten - an allen Stellen der Blutentnahme und ein starker Follow-up-Marker. Die stärkste prognostische Relevanz wurde für Pfortader-Blut festgestellt, das ein wirksames neues Instrument zur Identifizierung von Hochrisikopatienten sein könnte, die von einer neoadjuvante Behandlungen profitieren könnten. Darüber hinaus trägt die höhere Anzahl an mutierten *KRAS*-Kopien im Pfortader-Blut zu einer verbesserten technischen Durchführbarkeit der ddPCR bei.

Durch die großzügige Förderung der Hamburger Krebsgesellschaft e.V. wurde es mir ermöglicht die Ergebnisse dieses Projekts auf dem Kongress „Advances in Circulating Tumor Cells“ in Kalamata, Griechenland im Sommer 2021 im Rahmen einer Posterpräsentation vorzustellen.

Die in diesem Projekt gewonnenen Daten sind zur Publikation eines Papers „Peripheral and portal venous *KRAS* ctDNA detection as independent prognostic markers of early tumor recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma“, in dem Ich geteilter Erstautor bin, in „Clinical Chemistry“ (Impact Factor 12.1) akzeptiert worden und werden demnächst veröffentlicht.

Ursprünglich waren für dieses Projekt zwei Ansätze geplant. Zum einen war das Liquid-Biopsy-Projekt und zum anderen waren Experimente an von Patientengewebe gewonnenen PDAC-Tumor-Organoiden geplant. Da die Tumoroid-Experimente jedoch nicht rechtzeitig gestartet werden konnten, wurde der Fokus der Doktorarbeit auf das Liquid-Biopsy-Projekt verlagert und auch der Umfang der zu untersuchenden Blutproben erweitert, sodass letztendlich über 200 Blutproben analysiert wurden



Benedikt Markmann