

**Hamburg Krebsgesellschaft e.V.**  
**Z.Hd. Esther Rudolph**  
**Butenfeld 18**  
**22529 Hamburg**

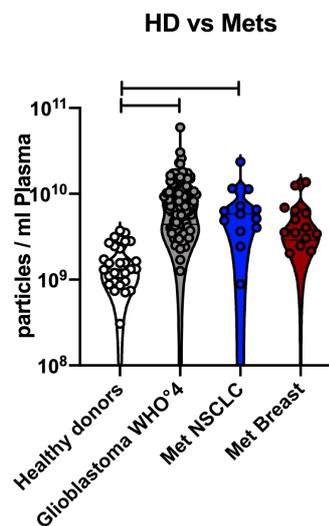
**Abschlussbericht des Forschungsantrags „Minimal-invasive Klassifikation von Patienten mit zerebralen Metastasen nichtkleinzelliger Lungenkarzinome anhand des extrazellulären Vesikel DNA Methylierungsprofils“**

21.01.2023

Sehr geehrte Frau Rudolph,

hiermit möchte ich mich für Ihre Zusage und damit einhergehende Finanzierung des Projekts: „Minimal-invasive Klassifikation von Patienten mit zerebralen Metastasen nichtkleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLCs) anhand des extrazellulären Vesikel DNA Methylierungsprofils“ bedanken. Im Rahmen dieses Projektes konnten wir einen Grundstein für die Etablierung einer Methylomanalyse aus dem Plasma von Patienten mit zerebralen Metastasen nichtkleinzelliger Lungenkarzinome legen. Die Arbeiten sind Teil eines umfangreichen Forschungsbestrebens zur Klassifikation von Hirntumoren mittels Methylomanalysen aus dem Plasma von betroffenen Patienten. Aufgrund der Corona Pandemie kam es leider zu immer noch andauernden Lieferengpässen der Zulieferer, wodurch das Projekt deutlich verzögert wurde und wir momentan an der Finalisierung und bioinformatischen Auswertung des Projektes arbeiten.

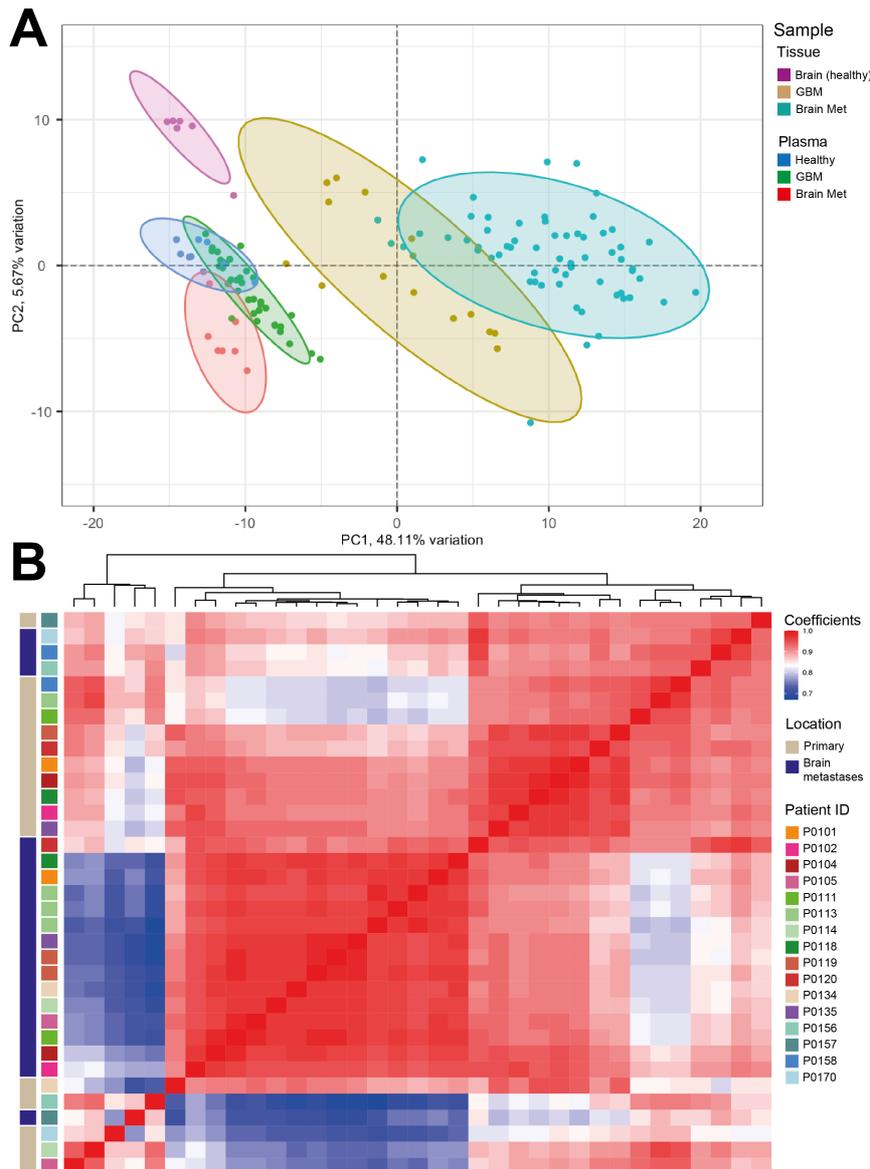
Ziel des Forschungsprojekts war die Bestimmung und Charakterisierung von extrazellulären Vesikeln im Blut von Patienten mit Hirnmetastasen eines NSCLCs. Zeitgleich haben wir Patienten mit Glioblastomen und Hirnmetastasen eines Mamma-CAs untersucht und die Ergebnisse mit denen durch Ihre Förderung ermöglichten Untersuchungen verglichen. Wir haben eine große Kohorte von 116 Glioblastompatienten, sowie 13 NSCLCs und 14 Mamma-Cas eingeschlossen und bei diesen Patienten Blut sowohl vor wie auch nach der Operation entnommen und im Anschluss sowohl extrazelluläre Vesikel (EV) wie auch zellfreie-DNA und EV-freie DNA isoliert. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit einer Glioblastom und einer Metastase eines NSCLCs eine erhöhte Anzahl von EVs im Blut besitzen.



**Abbildung 1** Nachweis von zirkulierenden EVs im Patientenblut. Patienten mit Glioblastom (GBM) und Hirnmetastasen (MET) von NSCLC weisen im Vergleich zu gesunden Spendern (HD) eine erhöhte Anzahl zirkulierender EVs auf, gemessen mittels NTA (\*P = 0,05; \*\*\*\*p <0,0001)11

Wahrscheinlich werden die EVs von Patienten mit einem Mamma-CA auch signifikant erhöht sein, sollten wir im Verlauf die Anzahl der Patienten steigern können (Ziel A) (Abbildung 1).

Im zweiten Arbeitsabschnitt (Ziel B) haben wir dann die DNA der EVs und die des Tumorgewebes einer genomweiten Methylierungsanalyse mittels 850K EPIC array unterzogen. Wir konnten zeigen, dass die Methylierung der EV-DNA aus dem Plasma der Patienten mit Hirnmetastasen eines NSCLCs sich von dem Methylierungsmuster von gesunden Proben unterscheidet und sich dieses auch im Tumorgewebe widerspiegelt (Abbildung 2A). Außerdem konnten wir zeigen, dass sich das Methylierungsmuster der Hirnmetastase von dem ursprünglichem Primärtumorgewebe unterscheidet und sich somit eine Hirnmetastasen spezifische Methylierungssignatur aufzeigt (Abbildung 2B). Diese Ergebnisse werden nun in einem größeren Kollektiv von Patienten mit unterschiedlichen Hirnmetastasen validiert und dann zeitnah veröffentlicht.



**Abbildung 2:** Methylierungsanalysen von Plasma und Gewebeproben von Patienten mit Hirnmetastasen A) Plasma EVs von Patienten mit einer Hirnmetastase eines NSCLC zeigen eine spezifische Methylierungssignatur, die sich auch im Gewebe des Tumors widerspiegelt. B) Gepaarte Untersuchung einer Hirnmetastase mit dem Gewebe des Primarius zeigen, dass Hirnmetastasen eine spezifische Methylierungssignatur aufzeigen.

Die Analyse der EV-Markerprofile des dritten Arbeitsprogramms (Ziel C) waren aufgrund von Engpässen bei den dafür benötigten Antikörpern bis jetzt noch nicht möglich und werden in den kommenden Wochen durchgeführt. Außerdem mussten wir das gesamte Plasma der gesammelten Proben für die Methylierungsanalyse benutzen um eine ausreichende Menge an qualitativ hochwertiger EV-DNA zu isolieren, sodass wir bereits weitere Plasmaproben gesammelt haben und die EVs bereits isolierten.

Unser Ziel ist nun Verlaufsbearbeitungen der zirkulierenden EVs bei Patienten mit NSCLCs durchzuführen, um hierdurch auf das Vorhandensein eines Rest-Tumors und/oder Tumorrezidivs und therapeutische Prognose rückschließen zu können.

Abschließend möchte ich Ihnen nochmals für Ihre Bereitschaft meinen Antrag zu unterstützen danken. Wir konnten durch unsere Arbeiten und Ihrer Unterstützung den Weg für eine Biomarker Technologie mittels Methylierungsanalyse für Patienten mit Hirnmetastasen ebnen und denken, in den kommenden Jahren einen signifikante Verbesserung für unsere Patienten zu erzielen.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Franz L. Bickl