

Abschlussbericht

Dr. Sabrina Köcher,

Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Zentrum für Onkologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Martinistr. 52

20246 Hamburg

s.koecher@uke.de

040 / 7410 - 52358

ERG-Überexpression als prädiktiver Biomarker für die PARP-Inhibitor-vermittelte Radiosensitivierung von Prostatatumoren

Zusammenfassung des Projektes und Ziele

Prostatakarzinome (PCa) stellen weltweit die häufigste Tumorentität und zweithäufigste tumorbedingte Todesursache bei Männern dar. Deshalb ist es dringend erforderlich, bisherige Therapieformen zu optimieren und neue Therapiestrategien zu entwickeln, beispielsweise durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren in der personalisierten Therapie. Eine der klassischen Säulen der PCa-Therapie ist die Strahlentherapie. Gezielt den Strahleneffekt im Tumor zu verstärken – bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes – wäre sinnvoll. Auf zellulärer Ebene wird als prädiktiver Test für die Strahlenempfindlichkeit und Strahlensensitivierbarkeit die Fähigkeit zur Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche genutzt. In diesem Projekt wurde eine innovative Methode, der sogenannte *ex-vivo*-Assay, angewendet, mit der dies auch an frischem Tumorgewebe von Patienten gemessen werden kann. Dadurch konnten wir bereits in den Vorarbeiten Prostatakarzinome identifizieren, die aufgrund defekter DNA-Reparaturwege durch den Einsatz des klinisch erprobten PARP-Inhibitors Olaparib gegenüber Bestrahlung sensitiviert werden können. Für eine klinische Umsetzung unserer Ergebnisse im Rahmen einer personalisierten Therapie ist es im nächsten Schritt nötig Biomarker zu identifizieren, die eine Radiosensitivierung durch PARP-Inhibition anzeigen. Unsere Vorarbeiten deuteten an, dass die Überexpression von ERG ein prädiktiver Biomarker hierfür sein kann. Ziel der vorliegenden präklinischen Studie war es, die ERG Überexpression als Biomarker für eine Radiosensitivierung durch Olaparib im PCa zu validiert.

Ergebnisse

Um ERG als prädiktiven Biomarker zu validieren, der eine Strahlensensitivierung durch Olaparib in PCa-Gewebeproben anzeigt, wurde eine Kohorte von 52 Tumorbiopsien von PCa Patienten gesammelt und *ex vivo* kultiviert. Bei allen Proben wurde der so genannte funktionelle *ex-vivo*-Assay durchgeführt. Dazu wurden analog zu Köcher *et al.* 2019 (Int J Cancer, 144, 1685-1696) 300 μm dünne Gewebescheiben hergestellt, kultiviert, bestrahlt (2Gy +/- Olaparib) und nach 24 h fixiert (kryo). Anschließend wurden Kryoschnitte für die Analysen hergestellt.

Im ersten Schritt wurde ERG gefärbt, um den ERG-Status der Proben zu bestimmen. Dazu wurde ein ERG-Score entwickelt, der sowohl die Menge (amount, a) ERG-positiver Zellen, als auch die Intensität (intensity, i) beinhaltet (Tabelle 1). Die Patientenproben wurden mindestens zwei Mal gefärbt und ausgewertet.

Tabelle 1: ERG scoring System

Proportion Score (amount)		% pos. cells	Intensity Score (intensity)	Intensity of positivity
0		≤ 1	0	none
1		2 - 10	1	weak
2		11 - 33	2	intermediate
3		≥ 34	3	strong

Anschließend wurden die Ergebnisse in einer heatmap zusammengestellt, sortiert absteigend nach dem Mittelwert aus a+i (Abb 1A). Im nächsten Schritt wurden γH2AX und 53BP1 als DNA-Doppelstrangbruch Marker analysiert und der Effekt von Olaparib + Bestrahlung vs Bestrahlung quantifiziert (PARP-inhibitor induced enhancement ratio, PiER), (Abb. 1B). Innerhalb der hier analysierten Probenkohorte konnten die Daten aus Köcher *et al.* 2019 bestätigt werden; nämlich, dass ca. 35% der Proben als „responder“ auf die Doppelbehandlung aus Olaparib plus Bestrahlung eingruppiert werden können. Eine direkte Korrelation von PiER mit a+i konnte allerdings nicht gefunden werden (Fig. 1C). Stattdessen wurde ein “cutoff” Wert für ERG-Positivität mit Hilfe der Software cutpointR in R ermittelt. Demnach wurde der “cutoff” Wert für ERG-Positivität mit a+i ≥ 1 berechnet (Abb. 1D). Somit wurden 42 % der analysierten Proben als ERG-positiv und 58% als ERG-negativ eingruppiert, was ungefähr dem Anteil ERG positiver PCa Tumoren entspricht (Minner *et al.* 2011). Besonders wichtig ist, dass 90% der in Abb. 1A ermittelten responder innerhalb der Gruppe der ERG-positiven Proben liegen (Abb. 1D: Balkenfarbe orange). Zusammenfassend konnten wir in dieser präklinischen Studie erstmalig zeigen, dass die ERG- Überexpression im PCa ein Biomarker für eine Radiosensitivierung durch Olaparib ist.

Diese Daten werden derzeit in einem Manuskript mit Affiliation Hamburger Krebsgesellschaft zur Publikation in der Fachzeitschrift zusammengestellt.

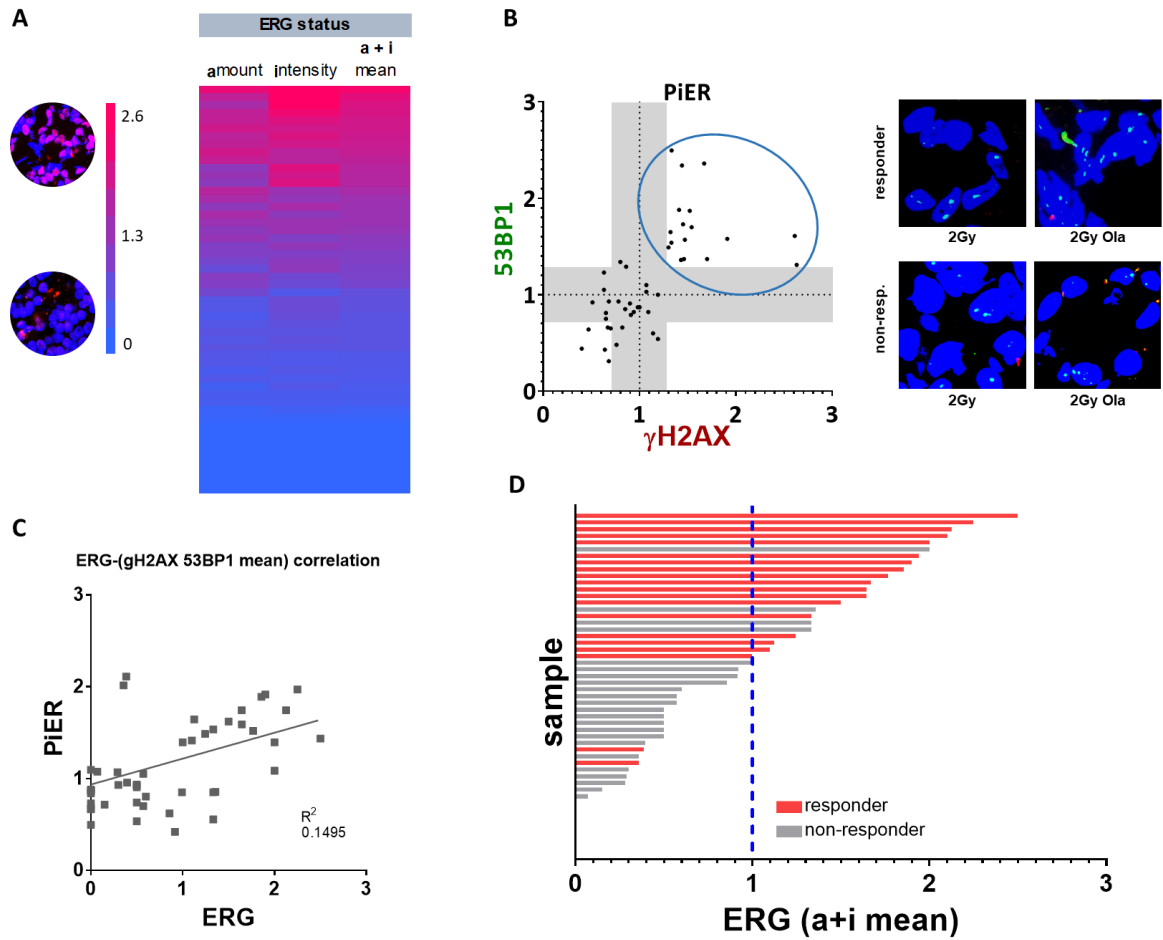


Abb. 1. ERG Status und DBS-Reparaturfähigkeit. A) ERG-Status von 52 PCa Gewebeproben dargestellt als heatmap. Bestimmung von amount (a) und intensity (i) mittels Immunfluoreszenz, sowie des des Mittelwertes aus a+i. B) Quantifizierung der PARP-inhibitor induced enhancement ratio (PIER) mittel Immunfluoreszenz nach *ex vivo* Bestrahlung mit 2Gy +/- PARPi. Blau markiert sind „responder“. C) Korrelation des ERG-Status aus A mit dem PiER-Score aus B, $R^2 = 0,1495$, nicht signifikant. D) Balkendiagramm des ERG-Scores der 52 PCa Proben in absteigender Reihenfolge. Grau = Non-responder, Orange = responder. „Cutoff“-Wert für ERG-Positivität liegt bei 1, blaue Linie.