

Isolierung und molekulare Charakterisierung von Glioma Stammzellen

Liquid Biopsy = CellprediKt® + Diagnostische Apherese

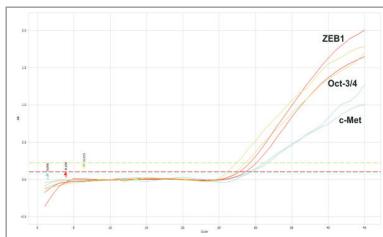
Dr. U. Kübler, Dr. J. Schnepel

Brain Tumor 2013, Berlin

Die Ursache des Glioblastoms ist der Verlust der Regelbarkeit normaler Gliazellen und die Entstehung von Tumor-Stammzellen in einer molekularen Nische. Die Dr. Kübler GmbH verfügt über ein patentiertes System zur Isolierung, Quantifizierung und molekularen Charakterisierung dieser Zellen. Nach Auflösung neuroektodermaler Zellschichten finden sich in der Blutbahn GFAP-exprimierende Tumor-Stammzellen, welche die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben und welche die Heterogenität sowohl des Primärtumors als auch der disseminierten Zellen widerspiegeln. Die Zellen verändern ihre spezifischen Eigenschaften und erlangen dadurch Migrationsfähigkeit und Invasivität. Sie befinden sich schon in der Blutbahn lange bevor der Primärtumor oder Metastasen bildgebend sichtbar werden. Das frühzeitige Erkennen dieser Zellen bedeutet eine Revolution in Vorsorge, Diagnostik und Therapie. ^[1-9]

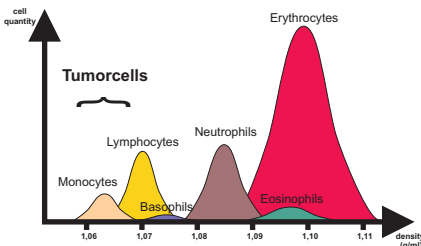
CellprediKt®

Mit Hilfe des CellprediKt®-Tests lassen sich mittels Real-Time RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) zirkulierende Zellen mit gestörter epithelio-mesenchymaler Transition in der Blutbahn qualitativ nachweisen. Der epithelial-mesenchymale Charakter dieser Zellen wird durch Überexpression bzw. Amplifikation von Oct-3/4, c-Met und ZEB1 dokumentiert. Zur Quantifizierung und exakten Charakterisierung der mit CellprediKt® detektierten Tumor-Stammzellen erfolgt die Diagnostische Apherese. ^[4, 5, 10, 11, 13]



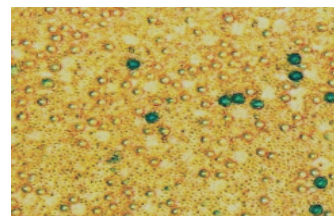
Diagnostische Apherese

Die Diagnostische Apherese ermöglicht die biopsiefreie und quantitative Gewinnung von Metastasen-initiiierenden Tumor-Stammzellen (metastasis initiating Cancer Stem Cells (MICs)) aus der Blutbahn, sowie deren vollständige molekular-pathologische Charakterisierung (c-Met, Oct-3/4, GFAP, EGFR, erbB2, erbB3, myc, ras, p53m, MDR, CD44v5/v6, VEGF, Akt/mTOR, IDO, Survivin, Urokinase). ^[7]



Detektion

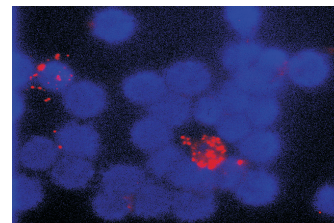
Ein speziell entwickelter ELISA-Test (enzyme linked immunosorbent assay) sowie die Anwendung der FISH-Analytik (fluorescence in situ hybridisation) erlaubt den Einzelzell-Nachweis und somit eine Quantifizierung. Durch die Bestimmung molekularer Biomarker wird ein Expressionsprofil der zirkulierenden Tumor-Stammzelle erstellt. ^[7,14]



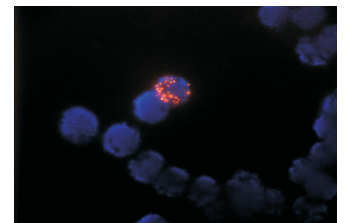
GFAP positive Zellen



Oct-3/4 positive Zellen



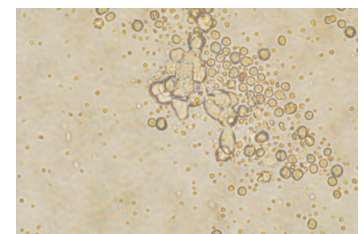
MET Genamplifikation



c-erbB2 Genamplifikation

Therapeutische Konsequenzen

Eine kombinierte Immuntherapie mit natürlichen Killerzellen und Heat-Shock-Proteinen kann Tumor-Stammzellen gezielt attackieren und vernichten. ^[15]



NK-Zellen

^[1] Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead, Lima, F.R. *et al.*, 2012, Biochim. Biophys. Acta, 1826(2), 338-349.

^[2] Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives, Anton, K. *et al.*, 2012, Haematol. Oncol. Clin. North Am., 26(4), 825-853.

^[3] New molecularly targeted therapies for glioblastoma multiforme, Polivka, J. *et al.*, 2012, Anticancer Res., 32(7), 2935-2946.

^[4] EMT, cancer stem cells and drug resistance, emerging axis of evil, Shing, A., Settlemann, J., Oncogene 2010, 29, 4741-4751.

^[5] p53 regulates epithelial mesenchymal transition and stem cell properties through modulating mi-RNAs, Chang, C., *et al.*, Nature Cell Biology 2011, 13, 317-323.

^[6] Cancer Stem Cells, Jordan, C.T., Guzman, M.L., Noble, M., N. Engl. J. Med. 2006 355;12, 1253-61.

^[7] c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases, Takeuchi, H. *et al.*, Clin Cancer Res 2003, Vol.9, 1480-1488.

^[8] Tumor cells circulate in the blood of all major carcinomas, but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases, Allard, W.J., *et al.*, Clin Can Res 2004, 10, 6897-6904.

^[9] The evidence for Cancer Stem Cells, Niederhuber, J., (NCI, Bethesda) 5th Int. H.F.C. Behr-Symposium 2008, DKFZ Heidelberg.

^[10] Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing, Gerlinger, M. *et al.*, 2012, N. Engl. J. Med., 366(10), 883-892.

^[11] Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, Thiery, J.P., *et al.* 2009, Cell 139, 871-890.

^[12] The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, Mani, S.A., 2008, Cell 133, 704-715.

^[13] Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits, Polyak, K., Weinberg, R.A., 2009, Nat Rev Cancer 9, 265-273.

^[14] Process for the *in vitro* diagnosis of a glioma or an astrocytoma and a pharmaceutical mixture for the treatment, Kübler, U., 2011, European Patent EP1486787B1.

^[15] Isolation and Characterization of Circulating Cancer Cells as Vaccine Candidates, Dr. Kübler GmbH, Cancer Vaccines 1996, New York.