

Abb. 1: Der Weg der Tumorzellen (Kasimir-Bauer 2018).

Die frühe Reise der Tumorzellen in andere Organe

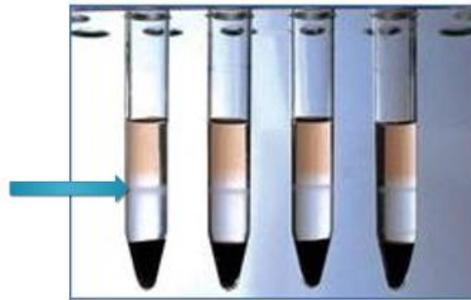
Tumorzellen sind in der Lage, sich schon frühzeitig vom Tumor zu lösen, um als zirkulierende Tumorzellen (ZTZ) über die Blutbahn in andere Organe einzuwandern, wo sie sich als sogenannte disseminierte Tumorzellen (DTZ) verstecken, teilweise über Jahre. Diese einzelnen Zellen sind weder durch hochauflösende bildgebende Diagnoseverfahren, noch durch die klassischen Untersuchungen der Pathologie nachweisbar. Man spricht hier tatsächlich auch von „**schlafenden Tumorzellen**“ (tumor cell dormancy), einem Phänomen, das man vorwiegend bei **Brustkrebs**, aber auch in gewissem Maße bei **Eierstockkrebs** kennt. Bevorzugt findet man die Zellen interessanterweise im **Knochenmark** und das bei ca **25-40%** der Patientinnen in der **Erstdiagnose** des Tumors, wenn sich noch keine Metastasen gebildet haben (Rack et al., 2013; Fehm et al., 2013). Dieses Phänomen hat uns schon Ende der 90er Jahr motiviert, die Tumorzellen auf ihrer Wanderung zu entdecken und zu charakterisieren, um für **unsere Patientinnen zusätzliche therapeutische Möglichkeiten** zu finden. Viele Fragen sind über die Jahre gestellt worden, die wir und andere Arbeitsgruppen bearbeitet haben:

- **Was passiert bei einer Knochenmarkpunktion?**
- **Wie häufig findet man Tumorzellen im Knochenmark?**
- **Haben die Tumorzellen im Knochenmark eine Bedeutung für die Prognose?**
- **Warum werden die Zellen nicht durch die gegebene Therapie zerstört?**
- **Sind alle Tumorzellen gleich?**
- **Warum können Tumorzellen an einem für sie fremden Ort überhaupt so lange schlafen?**
- **Kann man eine zusätzliche Therapie bekommen, wenn Zellen im Knochenmark vorhanden sind?**
- **Wieviel Information steckt in einer Blutprobe?**

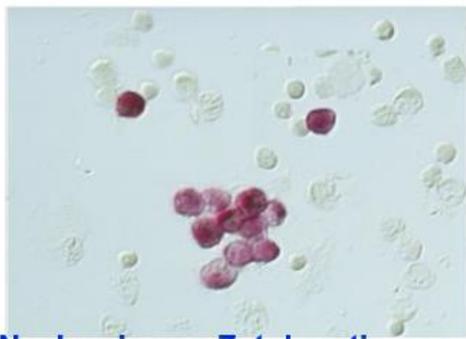
Was passiert bei einer Knochenmarkpunktion?



Beidseitige Knochenmarkpunktion



Dichtegradientenzentrifugation



Nachweis von Zytokeratin-pos („Zellgerüst“) Zellen (DTZ)



Automatisierte Auswertung

Abb. 2: Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen (DTZ).

Eine **Knochenmarkpunktion** wird während der Operation zur Tumorentfernung, also unter **Vollnarkose**, am linken und rechten Beckenkamm durchgeführt. Im Labor wird das Knochenmark dann in einer **Zentrifuge aufgetrennt** und die durch einen Pfeil in der **Abbildung 2** gekennzeichnete „weiße Bande“ (eine Gruppe der Blutzellen) entnommen, auf Objektträger gebracht und über Nacht getrocknet. Anschließend werden die Objektträger gefärbt, um **Gewebezellen der Brust** (in **dunkelrot** zu sehen) nachzuweisen. Dabei schauen wir speziell nach **Zytokeratin (CK)-positiven Zellen**. Bei CK handelt es sich um ein sogenanntes **Zellgerüst von Brustzellen**, das die Zellen in manchen Gewebetypen stabilisiert, jedoch im Knochenmark nicht zu finden ist, weil das Knochenmark ein anderer Gewebetyp ist. Finden wir bei unseren Patientinnen diese **CK-positiven Zellen**, so ist die **Wahrscheinlichkeit** sehr groß, dass dies **Brustkrebszellen** sind, die sich frühzeitig vom Tumor gelöst haben (Rack et al., 2013). Deshalb interpretieren wir die CK-positiven Zellen als **DTZ**. Wir sprechen hier von einer **Tumorzellwanderung** (Tumorzelldisseminierung) **in das Knochenmark**.

Wie häufig findet man DTZ im Knochenmark?

Bei **Brustkrebs** finden wir in ungefähr **30%** der Fälle, aber auch bei **Eierstockkrebs** in ca **40%** der Fälle **DTZ** (Rack et al., 2013; Fehm et al., 2013). Unterstützt wird diese Auswertung durch ein **automatisiertes Verfahren**, das es uns ermöglicht, möglichst viele Zellen einer Patientin zu beurteilen.

Haben DTZ eine Bedeutung für die Prognose?

Die **wichtigste Frage**, die sich schon in den 90er Jahren bei Patientinnen und Medizinern stellte war in erster Linie, ob diese Zellen tatsächlich eine **Bedeutung für die Prognose der Erkrankung** haben. Gerade in Deutschland haben viele Arbeitsgruppen an dieser Frage

gearbeitet. Da es sich beim Nachweis der Zellen im Knochenmark um eine **Standardmethode** handelt, die von allen Arbeitsgruppen verwendet wird, konnten **Daten von mehreren Tausend Brustkrebspatientinnen** in einer sogenannten **Meta-Analyse** ausgewertet werden. Schon im Jahre **2005** zeigte die von Braun et al., initiierte Bewertung von 4700 Patientinnen, dass der **Nachweis von DTZ** (rote Linie in **Abb. 3**) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit einer **ungünstigeren Prognose** verbunden war (Braun et al., 2005). Das galt nicht nur für die **Gesamtüberlebenszeit** (overall survival), sondern auch für die Zeit bis zum **Wiederauftreten der Erkrankung** bzw bis zur Metastasierung. Interessanterweise waren die Ergebnisse **unabhängig von** der jeweils gegebenen **Therapie**.

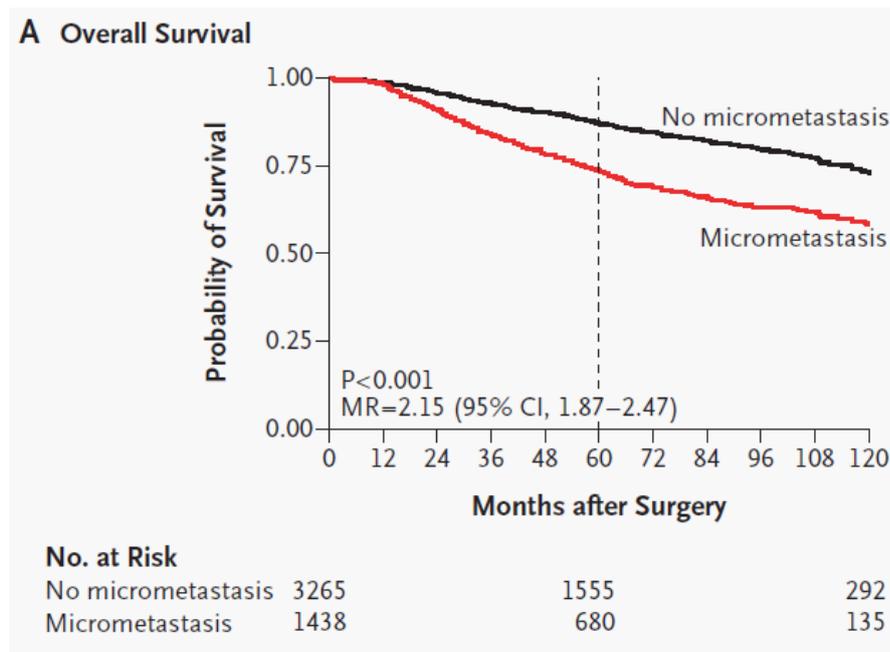


Abb. 3: Prognostische Bedeutung der DTZ bei Brustkrebs (*Braun et al., 2005*).

Aktuell hat Prof. Dr. Hartkopf aus der Universitätsfrauenklinik in Tübingen noch einmal alle Arbeitsgruppen, auch **uns** und **andere europäische Gruppen**, die diesen Nachweis geführt haben, motiviert, ihm die jeweiligen Daten zur Verfügung zu stellen. Somit konnten **über 10.000 Brustkrebspatientinnen** bewertet werden, wobei sich auch hier die **prognostische Bedeutung der DTZ bestätigte** (*Hartkopf et al., 2021*).

Eierstockkrebs tritt wesentlich seltener auf, weshalb sich auch nur Arbeitsgruppen mit dem Forschungsschwerpunkt **DTZ bei Eierstockkrebs** beschäftigt haben, in deren Kliniken sich eine Vielzahl von Patientinnen vorstellte und gleichzeitig ein Forschungslabor diese Thematik bearbeiten konnte. Dazu gehörten unsere Frauenklinik in **Essen**, die Universitätsfrauenklinik in **Tübingen** und die Frauenklinik in **München**. Bei fast **500 Patientinnen** und einem **Beobachtungszeitraum** von bis zu **8 Jahren** konnten wir auch hier zeigen, dass der Nachweis der **DTZ zum Zeitpunkt der Erstdiagnose** Eierstockkrebs mit einer **ungünstigeren Prognose** (**Abb. 4**) vergesellschaftet ist. Mittlerweile werden diese Untersuchungen auch in Dresden und Leipzig von zwei ehemaligen Oberärztinnen (Prof. Dr. Pauline Wimberger und Prof. Dr. Bahriye Aktas) unserer Klinik angeboten, die diese Thematik nach unserer Vorgehensweise in ihren jeweiligen Forschungslaboren etabliert haben.

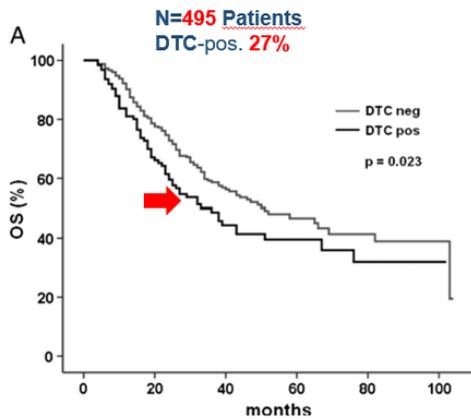


Abb. 4: Prognostische Bedeutung der DTZ bei Eierstockkrebs (Fehm, Kasimir-Bauer 2013).

Warum werden die Zellen nicht durch die gegebene Therapie zerstört?

Sind alle Tumorzellen gleich?

Schon in den frühen 90er Jahren wurde nachgewiesen, dass es sich bei den **DTZ** um **ruhende Zellen** handelt, die sich selten teilen und vermehren (Pantel et al., 1993). Da Chemotherapie jedoch nur sich teilende Tumorzellen angreifen kann, ist dies vermutlich auch der Grund, warum viele DTZ durch eine **Chemotherapie nicht beseitigt** werden können. Weitere Studien beinhalten, dass sich die **DTZ**, aber auch **ZTZ**, im Hinblick auf die Ausbildung der für die Therapieentscheidung wichtigen **Hormonrezeptoren** (Östrogen- und Progesteronrezeptor) und den Wachstumsfaktorrezeptor **HER2** vom Primärtumor **unterscheiden**. Häufig gehen Hormonrezeptoren auf den wandernden Tumorzellen verloren. Andererseits findet man bei ca **20%** der Patientinnen **HER2-positive DTZ/ZTZ**, wobei der jeweilige **Tumor** diesen **Rezeptor nicht** vorwies (Yeung et al., 2016; Zhang et al., 2021). Man vermutet, dass sich ZTZ auf ihrer Reise dermaßen verändern, dass sie plötzlich Merkmale erhalten, die sie vorher nicht hatten, die ihnen aber vermutlich einen Überlebensvorteil bieten. Andererseits könnten auch wenige, vom Pathologen nicht nachzuweisende Tumorzellen mit dem entsprechenden Oberflächenmarker auswandern und sich langsam vermehren.

Aus unseren **eigenen Studien** wissen wir, dass es sowohl bei **Brust-**, als auch bei **Eierstockkrebs Tumorzellen (Abb. 5 und 6)** gibt, die den sogenannten **Stammzellen** ähneln oder Marker ausprägen, die die Bildung solcher Zellen fördert. Dabei handelt es sich um **Zellen**, die sich immer wieder **selbst erneuern** können und somit sich selbst erhalten. Diese Zellen sind schon bei **Ersterkrankung vorhanden** und werden häufig durch die gegebene Therapie nicht beseitigt (Krawczyk et al., 2014). Ein weiteres Phänomen der Tumorzellen ist ein sogenannter „**Verkleidungscharakter**“, der es Ihnen ermöglicht, **unerkannt** zu bleiben. Wenn Tumorzellen ihren Gewebeverband in der Brust oder dem Eierstock verlassen, dann tragen sie noch die Merkmale dieses Gewebes, sie sind „**epithelial**“. Das Blut und Knochenmark hat aber einen anderen Charakter, man spricht hier von „**mesenchymal**“. Einige Tumorzellen sind so schlau, dass sie sich den Gegebenheiten schnell anpassen, sie verwandeln sich von **epithelial in mesenchymal**, was man in der Fachsprache als **EMT** (Epitheliale-Mesenchymale-Transition) bezeichnet. Zurückverwandeln können sie sich auch. Diese zu Beginn kleine Gruppe von Tumorstammzellen und Zellen in EMT haben ein gefährliches Potential, aber auch **resistente Tumorzellen** bei beiden Erkrankungen können zu einem schlechteren Verlauf führen.

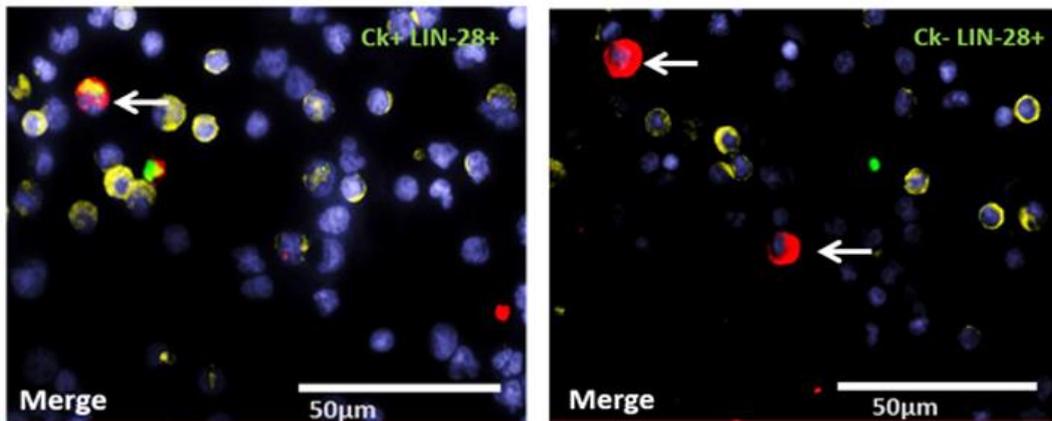


Abb. 5: DTZ mit Stammzellcharakter bei einer Patientin mit Eierstockkrebs. Im Bild links zeigt die DTZ (Pfeil) einen für Eierstockkrebs beschriebenen Stammzellmarker LIN28, sowie das Zellgerüst Zytokeratin. Im Bild rechts ist der Ursprungsgewebecharakter (Zytokeratin) nicht mehr vorhanden, wobei es sich vermutlich um eine DTZ in EMT handelt (*Chebouti, Kasimir-Bauer et al., 2016*).

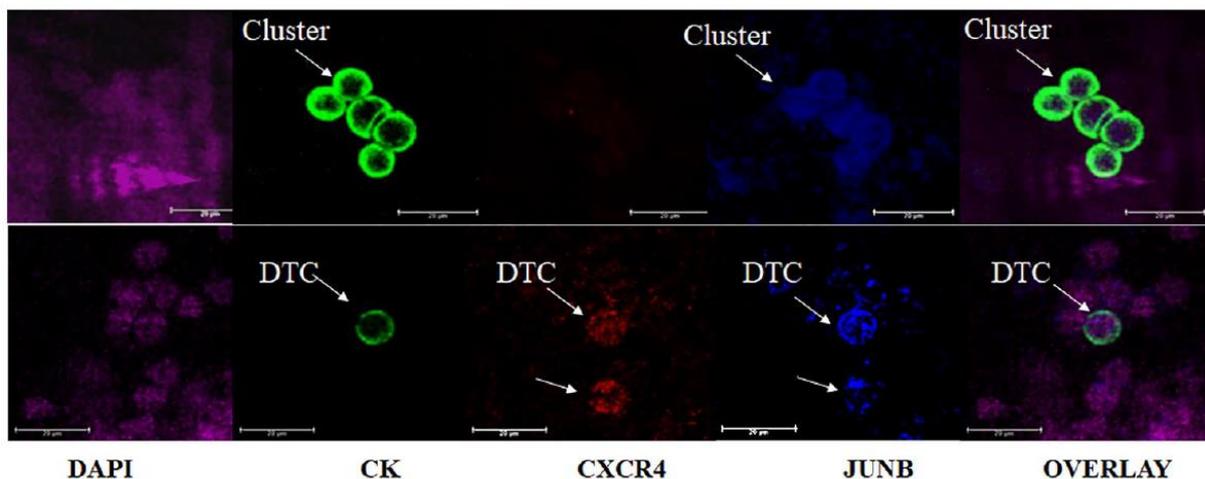
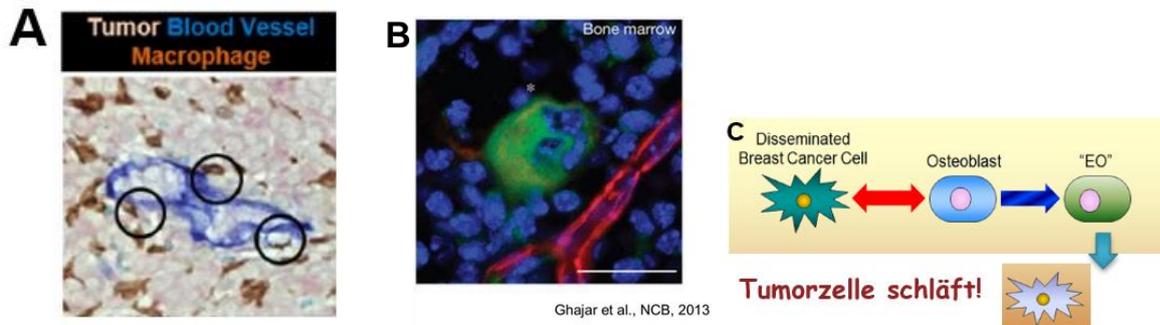


Abb. 6: DTZ mit Stammzellcharakter bei einer Patientin mit Brustkrebs. Die Abbildung zeigt zwei verschiedene DTZ-Typen innerhalb einer Patientin. Oben: DTC Cluster (Zusammenschluss von DTZ) mit Zellkern (Dapi, blau), Zellgerüst des Epithelgewebes, CK, Zytokeratin, grün), ohne den Marker CXCR4 (rot). Unten: Einzelne DTZ, die alle Marker aufweist (*Kallergi, Kasimir-Bauer et al., 2020*).

Warum können Tumorzellen an einem für sie fremden Ort überhaupt so lange schlafen?

Lange hat man sich gefragt, wie Tumorzellen es schaffen, so **lange** in einem für sie fremden Gewebe zu **schlafen**. Mittlerweile konnten einige Fragen beantwortet werden. Es beginnt schon im Tumor selbst, dass Tumorzellen sich ein sogenanntes „**Schlupfloch**“ schaffen, indem sie sich mit im Tumor befindlichen **Fresszellen** (Makrophagen) und **Gefäßzellen** verbünden (**Abb. 7a**). Im Knochenmark selbst **schlafen** sie gerne **in der Nähe von Gefäßen**, so dass sie sich auf die Reise machen können, sobald neue Blutgefäße gebildet werden und es somit zu einer Aussprossung der Gefäße kommt, die auch ein Schlupfloch bieten (**Abb. 7b**). Aktuell wurde veröffentlicht, dass Tumorzellen es auch schaffen, die **Knochen aufbauenden Zellen** (Osteoblasten), die eigentlich nicht dafür bekannt waren, Tumorzellen zu helfen, auf ihre Seite ziehen (**Abb. 7c**). Sobald DTZ das Knochenmark erreicht haben, beginnen sie mit einer Erziehungsmaßnahme und verändern diese Knochenzellen so, dass diese für einen ungestörten Schlaf der DTZ sorgen. Man nennt die Knochenzellen dann in der Fachsprache „**Educated Osteoblasts**“ (**erzogene/gebildete Osteoblasten**).



Coste et al., 2020

Abb. 7: Raffinieren der Tumorzellen. **A.** Tumorgewebe einer Brustkrebspatientin, „Schlupfloch“ im vergrößerten Ausschnitt (schwarze Kreise) bestehend aus Tumorzelle, Fresszelle und Gefäßzelle (aus Coste et al., 2020). **B.** Schlafende Tumorzelle (grün) in der Nähe eines Gefäßes (rot) (aus Ghajar et al., 2013). **C.** Umerzogener Osteoblast (aufbauende Knochenzelle) EO; educated osteoblast durch im Knochen eintreffende Brustkrebszelle (Disseminated Breast Cancer Cell) (aus Kolb et al., 2019).

Kann man eine zusätzliche Therapie bekommen, wenn Zellen im Knochenmark vorhanden sind?

Schon Ende der 90er Jahre wurde klar, dass nur eine Therapie außerhalb der klassischen Strategien (Rezeptor-unabhängig) diese Zellen beseitigen könnte. Prof. Ingo Diel veröffentlichte 1998, dass durch die Einnahme sogenannter **Bisphosphonate** [Clodronat (Ostac®)] nicht nur **Knochenmetastasen**, sondern auch **Leber-** oder **Lungenmetastasen** bei Patientinnen mit Brustkrebs **reduziert** wurden. Weiterhin **profitierten** diese Patientinnen signifikant im Hinblick auf das **Gesamtüberleben**. Bei Bisphosphonaten handelt es sich um Phosphat-ähnliche Stoffe, die „Lücken“ im Knochen wieder auffüllen. Bekannt sind sie durch **Vorbeugung gegen Osteoporose**.

Auf Basis dieser Daten haben wir seit 1998 jeder Patientin in der Essener Universitätsfrauenklinik die Einnahme von **Clodronat (Ostac)** für die Dauer von **zwei Jahren** empfohlen, wenn zum Zeitpunkt der Primärdiagnose Brustkrebs DTZ nachgewiesen wurden. Bei regelmäßigen Nachbeobachtungen unserer Patientinnen haben wir **interessanterweise** festgestellt, dass sich der internationale Trend einer **schlechteren Prognose** für Patientinnen mit DTZ **nicht bestätigt** hatte. Patientinnen mit DTZ im Knochenmark zu Beginn der Primärdiagnose und Einnahme von Clodronat hatten die gleiche Prognose wie die Patientinnen, bei denen wir keine DTZ gefunden hatten (**Abb. 8**). Das Bisphosphonat wirkt vermutlich nicht direkt auf die DTZ, sondern eher indirekt, indem die Knochen abbauenden Zellen (Osteoklasten), die in „Kontakt“ mit den Tumorzellen stehen und sie gewissermaßen auch ernähren, gehemmt werden, wodurch auch die DTZ ihren „Ernährer“ verlieren. Ähnliche Ergebnisse wurden durch andere Arbeitsgruppen mit dem Bisphosphonat Zoledronsäure erzielt, die in der Brustkrebstherapie häufig eingesetzt wird.

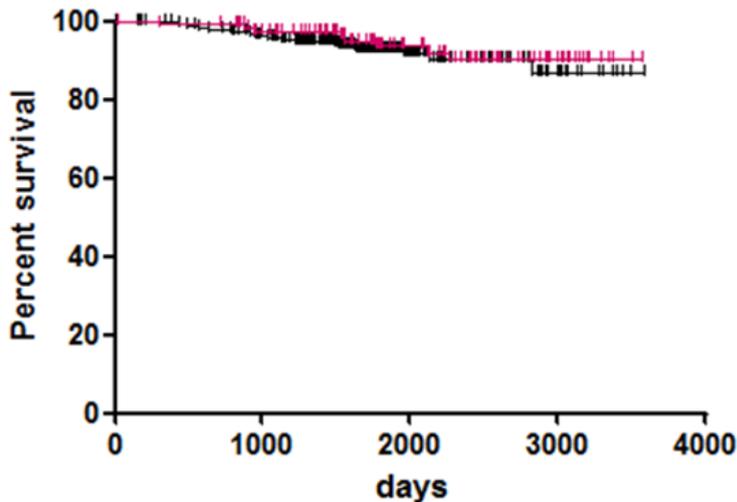


Abb. 8: Überlebenskurven von 500 Patientinnen mit der Erstdiagnose Brustkrebs. Überlebenskurve schwarz: Patientinnen ohne Nachweis von DTZ; Überlebenskurve magenta: Patientinnen mit Nachweis von DTZ und Einnahme von Clodronat. 5-Jahresüberlebensrate 92%; 10-Jahresüberlebensrate 87% (Kasimir-Bauer et al., 2016, modifiziert).

Auf diese, für unsere Patientinnen, schönen Ergebnisse wurde auch die Presse aufmerksam, so dass nicht nur unsere Lokalzeitung **WAZ 2010**, sondern auch **WDR** und **ARTE 2011** darüber berichteten.

RATGEBER GESUNDHEIT

Kampf den „Schläferzellen“

Brustkrebs: Die Essener Unfrauenklinik setzt parallel zur Chemo- und Strahlen-Therapie auf Bisphosphonate in Tablettenform

Julia Bübbes

Essen. Die schlechte Nachricht vorab: Über 58.000 Frauen erhalten in Deutschland jährlich die Diagnose Brustkrebs. Tendenz steigend, meldet das Robert Koch-Institut in Berlin, das die bundesweiten Krebsregister-Zahlen auswertet. Damit ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Die gute Nachricht: Brustkrebs kann immer erfolgreicher behandelt werden. In 70 bis 80 Prozent der Fälle kann die Brust bei der Krebstherapie erhalten werden. Und zwei Drittel der Betroffenen überleben den Krebs.

Von Patientinnen und Ärzten gefürchtet werden zu genannter „schlafender“ Krebserkrankung. Der Grund: Diese können noch Jahre nach einer Krebstherapie zu Metastasen, etwa in den Knochen, führen. An der Universitätsfrauenklinik in Essen hat man diesen „Schläferzellen“ den Kampf angelegt und hofft

»Brustkarzinome können auch in einem frühen Stadium streuen«



Die Mammografie: Über 58.000 Frauen erhalten in Deutschland jährlich die gefährliche Diagnose Brustkrebs.

Foto: ddp

gute Erfahrungen mit so genannten Bisphosphonaten gemacht. Die Forscher nahmen an, dass Bisphosphonate, die Brustkrebs-Patientinnen in Tablettenform erhalten, im Vergleich mit der Chemotherapie noch effektiver machen. Bisphosphonate werden normalerweise von Krebs-Patientinnen zur Vorbeugung von Osteoporose oder bei Knochenmetastasen eingesetzt. Die Verabreichung der Weinschäufel-Bisphosphonate können auch Tumorzellen „auslöschen“.

Professorin Sabine Kasimir-Bauer und ihre Forscherkollegen beschäftigen sich an der Essener Unfrauenklinik seit Jahren mit Tumorzellen, die bei Metastasen den Tumoreffektivität verlieren, in das Knochenmark einwandern und dort als so genannte „schlafende“ Zellen verbleiben können. „Insbesondere ist wichtig, dass diese Zellen bei 15 Prozent der Patientinnen sogar eine Chemotherapie überleben. Auch eine antihormonelle Behandlung scheint gegen sie oft erfolglos“, betont Kasimir-Bauer.

Selbst bei 50 Prozent der Brustkrebs-Patientinnen, bei denen die Lympheknötchen nicht von Tumorzellen befallen waren, konnten Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden. „Brustkarzinome können also auch in einem frühen Stadium streuen“, so die Professorin. Patientinnen, bei

denen im Knochenmark „Schläferzellen“ gefunden wurden, können in Essen parallel zur Chemo- oder Strahlentherapie Bisphosphonate in Tablettenform erhalten. Im Vergleich mit dieser zwei Jahre lang einzuhalten.

„Es gibt erste Anzeichen durch größere klinische Studien, dass Bisphosphonate in Zukunft ein fester Bestandteil der Standardtherapie von Brustkrebs-Patientinnen sein werden“, betont Professorin Sabine Kasimir-Bauer. Durch diese Therapie könnte vielleicht das Risiko des Wiederauftretens des Krebses für die betroffenen Frauen minimiert werden. In einer Pilotstudie der Essener Unfrauen-

ZUR PERSON: PROF. KASIMIR-BAUER
Brustkrebs-Forschungspreis von Patientinnen

Professorin Sabine Kasimir-Bauer leitet das wissenschaftliche Labor der Essener Unfrauenklinik. Die Biologie wurde im vergangenen Jahr gemeinsam mit Professorin Julia Hüter von der Universitätsfrauenklinik Tübingen mit dem so genannten „Julien-Preis“ ausgezeichnet. Ein Preis von Patientinnen der größten Selbsthilfegruppe Brustkrebs („Mammazone“) in Deutschland für engagierte Brustkrebsforscherinnen.

Das war die Sabine Kasimir-Bauer von der amerikanischen Gesellschaft für Krebsforschung eingeladen, um in eine Forschungsarbeit auf einem Kongress für Grundlagenforschung in Washington zu stellen.

Unfrauenklinik wurde gezeigt, dass die Einnahme von Bisphosphonaten – so effektiv – selbst Jahre nach einer Krebstherapie Behandlung noch zum Absterben von Tumorzellen führte.

»Es gibt Anzeichen, dass Bisphosphonate ein fester Bestandteil der Therapie werden«

Sabine Kasimir-Bauer leitet das wissenschaftliche Labor der Essener Unfrauenklinik. Den Schwerpunkt ihrer Forschungen hat die Biologie auf die Suche nach Tumorzellen gelegt. Diese können sich selbst erneuern



und machen etwa ein bis fünf Prozent der Zellen eines Tumors aus. Es wird vermutet, dass nur Tumorzellen mit einem bösartigen Charakter haben und später zu Metastasen führen können, alle anderen Zellen im Blut, brennend im Knochenmark identifizieren, um dann in Zukunft durch spezifische Therapie eine Streuung des Tumors zu verhindern“, erläutert die 47-Jährige. Untersuchungen auf „Schläferzellen“ Notet die Essener Unfrauenklinik in der Essener Unfrauenklinik jeder ihrer Brustkrebs-Patientinnen an. Nach diesen Zellen, besetzt Kasimir-Bauer, könne allerdings nicht in jedem Labor, sondern nur in Speziallabors von Universitätsklinikern gefordert werden. Diese gibt es in Deutschland neben Essen unter anderem noch an der Universitätsklinik Düsseldorf, in München, Hamburg und in Tübingen.

Die Suche nach Tumorzellen mit Stammzellcharakter ist noch in der Anfangsphase und wird nur innerhalb von Forschungsprogrammen durchgeführt. Die Unfrauenklinik Essen hat eine Kooperation mit Stammzellforschern der Universitätsklinik in den USA aufgebaut. Während der Nachweis so genannter „schlafender“ Tumorzellen im Knochenmark national und international nach einem Standardverfahren durchgeführt wird, wollen die Essener Weinschäufel auch für den Nachweis im Blut einen einheitlichen Standard finden, um den Stellenwert dieser Untersuchung in klinischen Studien zu überprüfen. Um dieses Ziel schnell zu erreichen, haben sich in Deutschland die genannten Spezialkliniken in Essen, Düsseldorf, München, Hamburg und Tübingen zusammengeschlossen.

RATGEBER

Hier gibt es Hilfe!

Die Deutsche Krebshilfe in 61113 Bonn (Bismarck 32) versteht zu den verschiedenen Krebsarten auch die Brustkrebsarten. Sie bietet eine „Frauen-Eligne“ an. Telefonieren Sie unter der Nummer 0228/729 800. Der Ratgeber „Brustkrebs“ hat die Nr. 2, der Ratgeber „Prävention von Brustkrebs“ die Nr. 18. Über die Internet-Seite der Krebshilfe (www.krebshilfe.de) können diese als PDF-Dateien heruntergeladen werden. Die Kontaktadressen der Krebshilfe sind: **0228/729 8096**.

Die Essener Unfrauenklinik Essen hat eine Kooperation mit Stammzellforschern der Universitätsklinik in den USA aufgebaut. Während der Nachweis so genannter „schlafender“ Tumorzellen im Knochenmark national und international nach einem Standardverfahren durchgeführt wird, wollen die Essener Weinschäufel auch für den Nachweis im Blut einen einheitlichen Standard finden, um den Stellenwert dieser Untersuchung in klinischen Studien zu überprüfen. Um dieses Ziel schnell zu erreichen, haben sich in Deutschland die genannten Spezialkliniken in Essen, Düsseldorf, München, Hamburg und Tübingen zusammengeschlossen.



Das Blut als „Liquid Biopsy“ (Flüssigkeitsbiopsie)

Wieviel Information steckt in einer Blutprobe?

Seit langer Zeit besteht der Wunsch, **alle Informationen** über das aktuelle Tumorgeschehen im Körper **aus einer Blutprobe** zu ziehen, da eine Knochenmarkpunktion zur Beobachtung des Krankheitsgeschehens nicht vertretbar ist. Somit haben sich viele Arbeitsgruppen mit der Gewinnung und Charakterisierung von **zirkulierenden Tumorzellen (ZTZ) im Blut** beschäftigt. Obwohl es hier, anders als beim Knochenmark, **keine Standardmethode** gibt, kamen letztendlich alle Arbeitsgruppen zum gleichen Ergebnis. Findet man bei **Brust- und Eierstockkrebs** zu Beginn der Erkrankung **ZTZ im Blut**, was bei **20%** (Brustkrebs) und **30%** (Eierstockkrebs) der Patientinnen der Fall ist, ist dies mit einem ungünstigeren Verlauf der Erkrankung vergesellschaftet (**Abb 9 und 10**). **ZTZ** zeigen auch vergleichbare Eigenschaften wie DTZ. Die **Rezeptoren** auf der Oberfläche gehen **verloren**, die Zellen haben **Stammzellcharakter**, wandeln sich um (**EMT**) und sind häufig **resistent**. Besonders beim **Ovarialkarzinom** ist auffällig, dass **ZTZ gerade nach Therapie viel mehr ZTZ in EMT** aufweisen und **resistente ZTZ**, die schon zu Beginn der Erkrankung gefunden wurden, **nach Therapie** immer noch nachweisbar sind (**Chebouti, Kasimir-Bauer et al., 2017 a und b**).

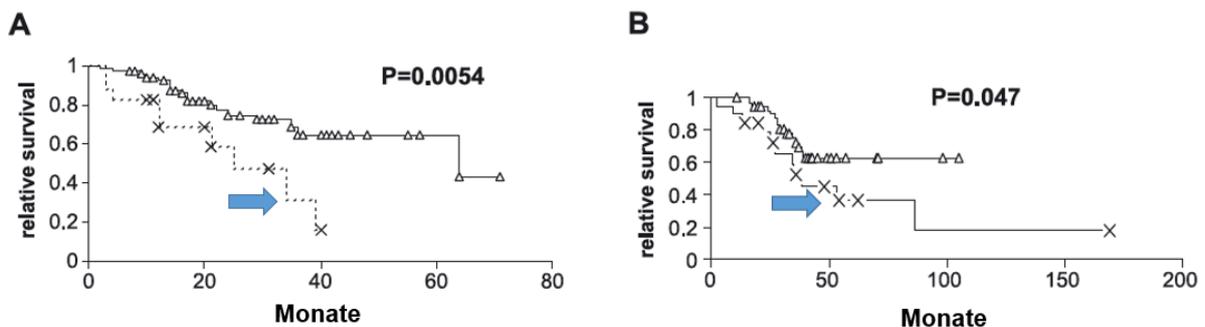


Abb. 9: Prognostische Bedeutung der ZTZ bei Eierstockkrebs vor (A) und nach (B) Therapie. Patientinnen mit ZTZ im Blut (blauer Pfeil) zeigen eine kürzere Überlebenszeit (**Aktas, Kasimir-Bauer et al., 2011**).

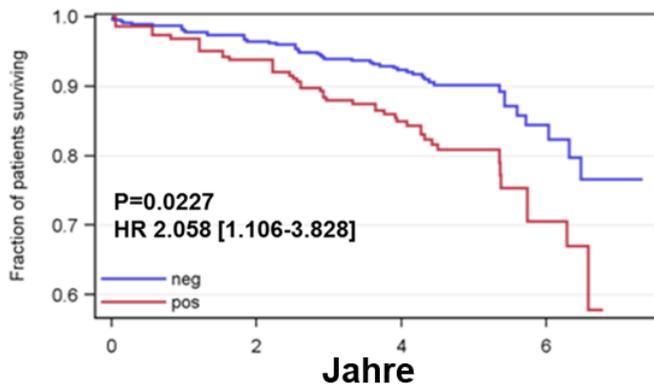


Abb. 10: Prognostische Bedeutung der ZTZ bei Brustkrebs vor Operation und Therapie. Patientinnen mit ZTZ im Blut (rote Linie) zeigen eine kürzere Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung (*Kasimir-Bauer et al., 2016*).

Während die bisherigen Untersuchungen in der Gesamtheit der ZTZ erfolgte, charakterisieren wir in einem aktuellen, von der **Deutschen Krebshilfe** geförderten Projekt, **einzelne ZTZ** im Verlauf der Erkrankung. Mit diesen aufwendigen Versuchen (dargestellt in **Abb. 11**) wollen wir z. B. herausfinden, welche ZTZ eine Therapie überleben und letztendlich eine Metastase bilden könnten. Aktuell hat **Frau Salmon**, die sich im Rahmen ihrer **Doktorarbeit** mit diesem Thema beschäftigt, die erarbeitete Methodik sowie die ersten Daten veröffentlicht (*Salmon et al., 2021*).

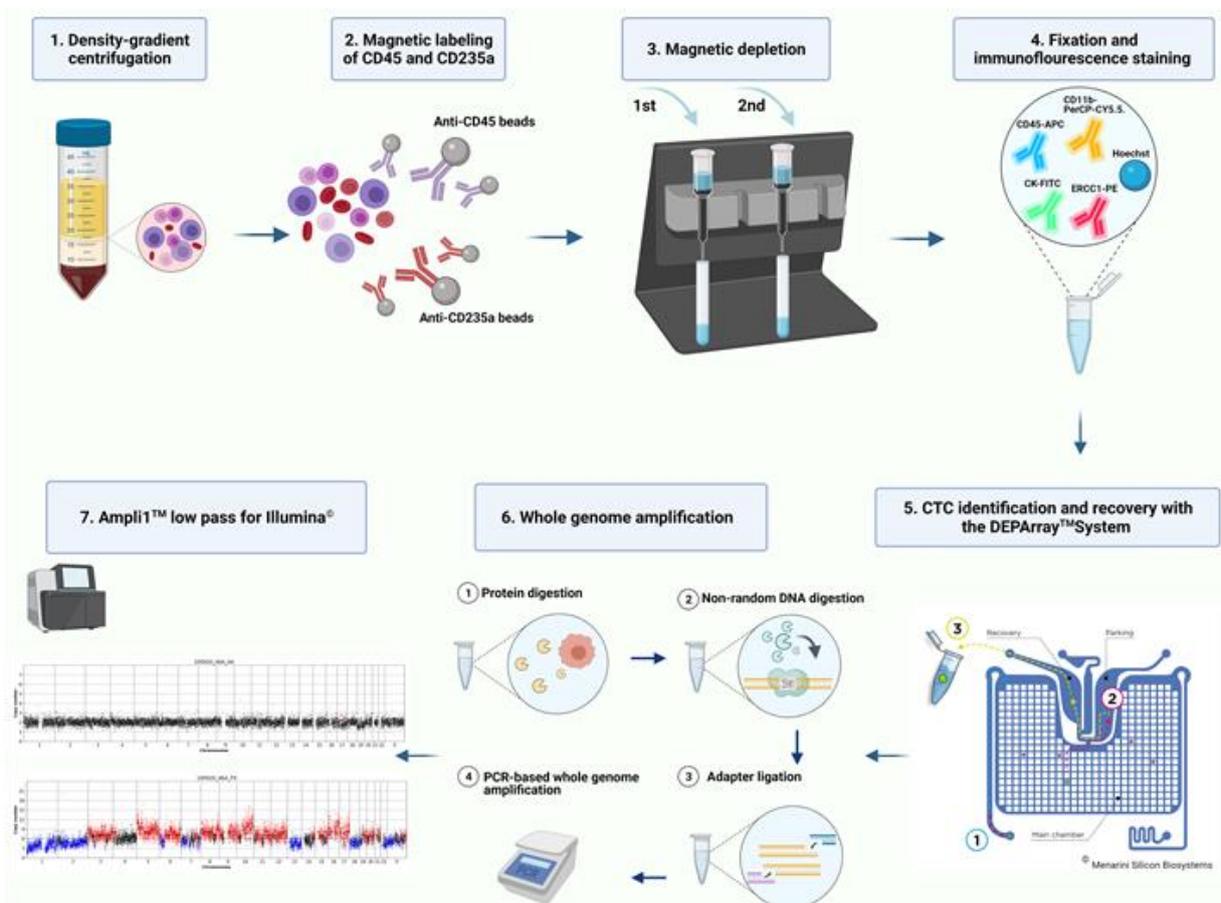


Abb. 11: Arbeitsablauf für die Isolierung und molekulare Charakterisierung einzelner ZTZ (hier CTC) im Blut von Patientinnen mit Eierstockkrebs. 1: Auftrennung des Blutes über Dichtegradientenzentrifugation; 2 und 3: Magnetische Entfernung von roten Blutkörperchen (CD235a) und weißen Blutzellen (CD45); 4: Fixierung und Anfärbung der ZTZ mit ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen; 5: Sortierung von einzelnen Zellen im sogenannten DEPArray™ Nxt System; 6 und 7: Molekulare Charakterisierung einzelner ZTZ (**Abb wurde erstellt mit BioRender.com; aus Salmon et al., 2021**).

Im Rahmen der sogenannten „Liquid Biopsy“ sind aber nicht nur die **Tumorzellen**, sondern auch **ihre „Bestandteile“** in das Interesse gerückt (**Abb. 12**). Dazu gehört die zirkulierende Erbinformation der Tumorzellen (**ztDNA**), aber auch andere Informationsträger (**miRNA**), die die Tumorzelle gerne auch mal in kleine Pakete (**Exosomen, extrazelluläre Vesikel**) verpackt, die andere Zellen dann aufnehmen können. Somit werden **Informationen verschickt** und von anderen Zellen aufgenommen, wie bei der Post. Insgesamt ist das Blut als Informationsquelle ein sehr komplexes System, bei dem auch das **Immunsystem** eine **große Rolle** spielt (**Kasimir-Bauer 2018; Keup; Kimmig, Kasimir-Bauer, 2020**).

Frau **Dr. Corinna Keup** aus unserer Arbeitsgruppe hat sich während ihrer **Doktorarbeit** und **auch aktuell** mit der Frage beschäftigt hat, **welcher Marker** im Blut für die Patientin am **Wichtigsten** ist. In zahlreichen Vergleichsstudien im Blut von Brustkrebspatientinnen, die schon Metastasen gebildet hatten, konnte Frau Dr. Keup zeigen, dass **jeder Marker andere Informationen** beinhaltet. Vergleicht man **zwei Marker**, z.B. die Informationen von ZTZ und Vesikeln, so sind **Übereinstimmungen** sehr **gering** (**Abb. 13A**). Betrachtet man aber **mehrere Marker gemeinsam**, so wird letztendlich für die Patientin die **Gesamtanalyse entscheidend** sein (**Abb. 13B**). **Aktuell** wurden diese umfassenden Untersuchungen in der hochrangigen wissenschaftlichen Zeitschrift „**Genome Medicine**“ mit Frau Keup als Erstautorin veröffentlicht (**Keup et al., 2021**).

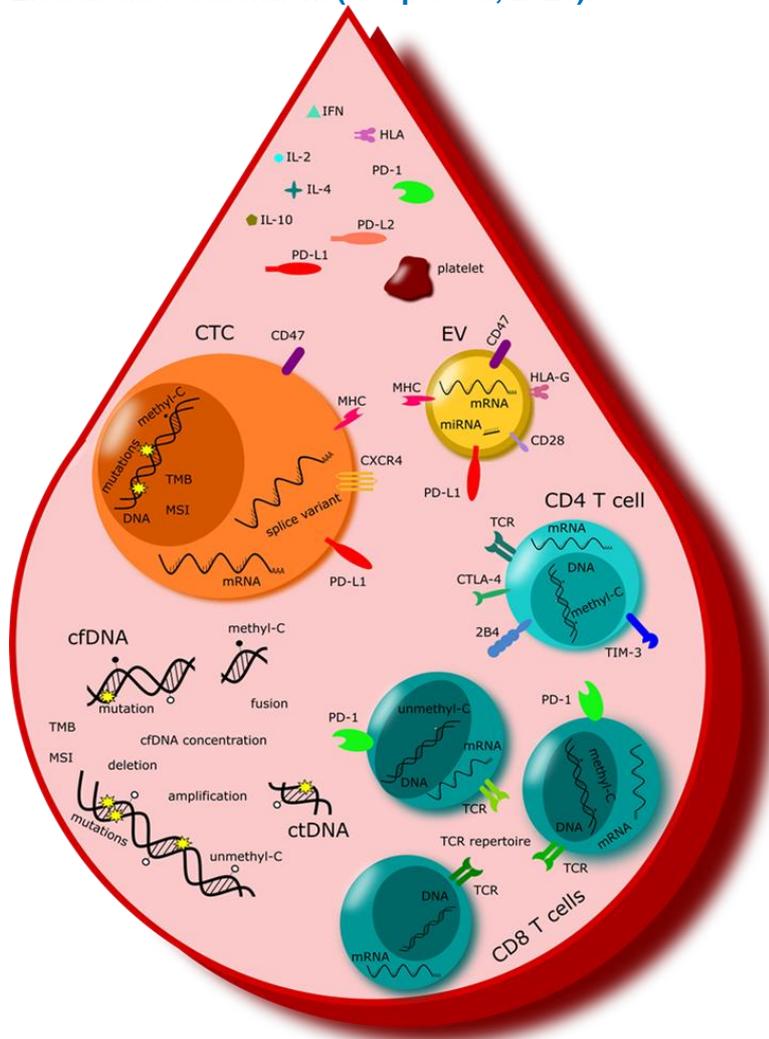


Abb. 12: Bestandteile der „Liquid Biopsy“. Zirkulierende Tumorzellen (hier: CTC, orange), extrazelluläre Vesikel (EVs, gelb), TumordNA (ctDNA) und das Immunsystem (weiße Blutkörperchen (Lymphozyten) und ihre Bestandteile sind Informationsträger des Tumorgeschehen (**Keup, Kimmig, Kasimir-Bauer 2020**).

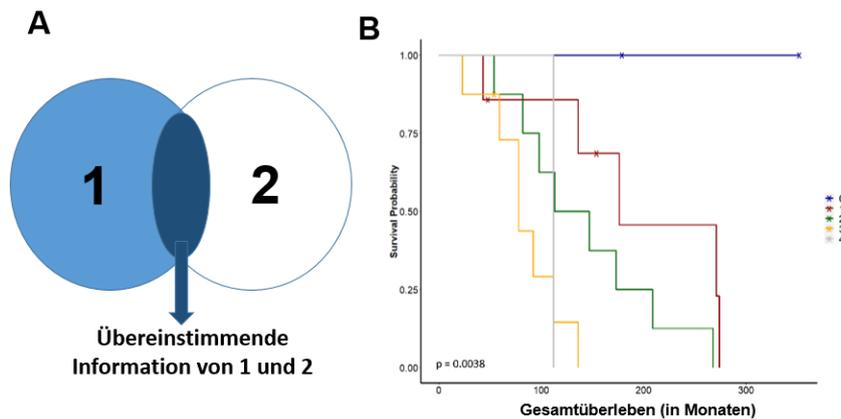


Abb. 13: Bedeutung einer Multi-Markeruntersuchung. **A** Informationsgehalt zweier Blutmarker, z.B. [ZTZ (1) und Vesikel (2)], wobei nur wenige gleiche Informationen in beiden Markern vorhanden sind. **B.** Überlebenskurven von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs aufgrund des Auftretens von „bösartigen Ereignissen“: **blau:** kein Marker verändert, längeres Gesamtüberleben; **rot:** ein Marker verändert; **grün:** 2 Marker verändert; usw. Das Gesamtüberleben verkürzt sich mit der Anzahl der „bösartigen Ereignissen“ (**Keup et al., 2021**).

Literatur

Kasimir-Bauer S. Zirkulierende Tumorzellen und was sie beinhalten: Sind »Liquid Biopsies« die Zukunft? *gynäkologische praxis* 44, 75–84 (2018).

Rack B, Müller V, Fehm T, Pestka A, Kasimir-Bauer S, Friese K, Janni W. Knochen als Rückzugsort für „dormant cells“. *Gynäkologe* 2013, 46:250–254.

Fehm T, Banys M, Rack B, Janni W, Marth C, Blassl C, Hartkopf A, Trope C, Kimmig R, Krawczyk N, Wallwiener D, Wimberger P, Kasimir-Bauer S. Pooled analysis of the prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2013 Jun;23(5):839-45.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25;353(8):793-802.

Hartkopf AD, Brucker SY, Taran FA, Harbeck N, von Au A, Naume B, Pierga JY, Hoffmann O, Beckmann MW, Rydén L, Fehm T, Aft R, Solà M, Walter V, Rack B, Schuetz F, Borgen E, Ta MH, Bittner AK, Fasching PA, Fernö M, Krawczyk N, Weilbaecher K, Margelí M, Hahn M, Jueckstock J, Domschke C, Bidard FC, Kasimir-Bauer S, Schoenfish B, Kurt AG, Wallwiener M, Gebauer G, Klein CA, Wallwiener D, Janni W, Pantel K. Disseminated tumour cells from the bone marrow of early breast cancer patients: Results from an international pooled analysis. *Eur J Cancer*. 2021 Jul 12;154:128-137.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Sep 1;85(17):1419-24.

Yeung C, Hilton J, Clemons M, Mazzarello S, Hutton B, Haggart F, Addison CL, Kuchuk I, Zhu X, Gelmon K, Arnaout A. Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours—a review. *Cancer metastasis reviews*. 2016;35(3):427-37.

Zhang H, Lin X, Huang Y, Wang M, Cen C, Tang S, Dique MR, Cai L, Luis MA, Smollar J, Wan Y, Cai F. Detection Methods and Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Front Oncol.* 2021 Jun 2;11:652253.

Krawczyk N, Meier-Stiegen F, Banyas M, Neubauer H, Ruckhaeberle E, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Biomed Res Int.* 2014;2014:415721.

Chebouti I, Blassl C, Wimberger P, Neubauer H, Fehm T, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Analysis of disseminated tumor cells before and after platinum based chemotherapy in primary ovarian cancer. Do stem cell like cells predict prognosis? *Oncotarget.* 2016 May 3;7(18):26454-64.

Kallergi G, Hoffmann O, Bittner AK, Papadimitriou L, Katsarou SD, Zacharopoulou N, Zervakis M, Sfakianakis S, Stournaras C, Georgoulas V, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. CXCR4 and JUNB double-positive disseminated tumor cells are detected frequently in breast cancer patients at primary diagnosis. *Ther Adv Med Oncol.* 2020 Apr 28;12:1758835919895754.

Coste A, Karagiannis GS, Wang Y, Xue EA, Lin Y, Skobe M, Jones JG, Oktay MH, Condeelis JS, Entenberg D. Hematogenous Dissemination of Breast Cancer Cells From Lymph Nodes Is Mediated by Tumor MicroEnvironment of Metastasis Doorways. *Front Oncol.* 2020 Oct 26;10:571100.

Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H, Almeida D, Koller A, Hajar KA, Stainier DY, Chen EI, Lyden D, Bissell MJ. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol.* 2013 Jul;15(7):807-17.

Kolb AD, Shupp AB, Mukhopadhyay D, Marini FC, Bussard KM. Osteoblasts are "educated" by crosstalk with metastatic breast cancer cells in the bone tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2019 Feb 27;21(1):31.

Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med.* 1998 Aug 6;339(6):357-63.

Kasimir-Bauer S, Reiter K, Aktas B, Bittner AK, Weber S, Keller T, Kimmig R, Hoffmann O. Different prognostic value of circulating and disseminated tumor cells in primary breast cancer: Influence of bisphosphonate intake? *Sci Rep.* 2016 May 23;6:26355.

Aktas B, Kasimir-Bauer S, Heubner M, Kimmig R, Wimberger P. Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2011 Jul;21(5):822-30.

Chebouti I, Kasimir-Bauer S, Buderath P, Wimberger P, Hauch S, Kimmig R, Kuhlmann JD. EMT-like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum-based chemotherapy. *Oncotarget.* 2017 Jul 25;8(30):48820-48831.

Chebouti I, Kuhlmann JD, Buderath P, Weber S, Wimberger P, Bokeloh Y, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. ERCC1-expressing circulating tumor cells as a potential diagnostic tool for monitoring response to platinum-based chemotherapy and for predicting post-therapeutic outcome of ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017 Apr 11;8(15):24303-24313.

Salmon C, Levermann J, Neves RPL, Liffers ST, Kuhlmann JD, Buderath P, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Image-based identification and genomic analysis of single circulating tumor cells in high-grade serous ovarian cancer patients. *Cancers,* 2021.

Keup C, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Liquid Biopsies to Evaluate Immunogenicity of Gynecological/Breast Tumors: On the Way to Blood-Based Biomarkers for Immunotherapies. *Breast Care (Basel)*. 2020 Oct;15(5):470-480.

Keup C, Suryaprakash V, Hauch S, Storbeck M, Hahn P, Sprenger-Haussels M, Kolberg HC, Tewes M, Hoffmann O, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Integrative statistical analyses of multiple liquid biopsy analytes in metastatic breast cancer. *Genome Med*. 2021 May 17;13(1):85.