Zirkulierende Tumorzellen und was sie beinhalten: Sind »Liquid Biopsies« die Zukunft?

S. Kasimir-Bauer

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Essen

Flüssigbiopsie – zirkulierende Tumorzellen – zirkulierende DNA – extrazelluläre Vesikel

chirurgische praxis 86, 125–134 (2019)
Mediengruppe Oberfranken – Fachverlage GmbH & Co. KG

Tumordiagnose aus dem Blut – Die Möglichkeiten der Liquid Biopsy

In den letzten Jahren hat sich besonders in der Onkologie der Begriff »Liquid Biopsy« (Flüssigbiopsie) etabliert. Darunter versteht man die Analytik von Körperflüssigkeiten zur Früherkennung, Diagnose und Verlaufskontrolle, vielleicht sogar zur Therapieentscheidung von Tumorerkrankungen. Im Vordergrund steht die blutbasierte Analytik, in erster Linie die Analyse von zirkulierenden Tumorzellen sowie deren informationstragende RNA und DNA (▶Abb. 1) [1]. Ein besonderer Vorteil in der Onkologie besteht darin, die Tumorlast nicht-invasiv zu beobachten und zu kontrollieren, um Resistenzen gegenüber der jeweils applizierten Therapie zu entdecken oder den Patientinnen/Patienten Biopsien in der metastasierten Situation zu ersparen. Was bedeutet dies für gynäkologische Tumoren, insbesondere das Mammakarzinom, für das die meisten Studien vorliegen?

Über 70.000 Frauen erhalten in Deutschland jährlich die Diagnose Brustkrebs, meldet das Robert Koch-Institut in Berlin [2]. Trotz erfolgreicher Behandlung in 70–80 % der Fälle kann es auch Jahre später noch zu einem Rückfall der Erkrankung kommen. Ist die Erkrankung einmal metastasiert, kann die Patientin nur noch palliativ behandelt werden. In jeder Phase der Erkrankung besteht der Wunsch, die Patientin zielgerichtet zu behandeln. Doch wo findet man das Ziel? Bisher wird die Therapieentscheidung aufgrund prädiktiver Marker (z. B. Hormonrezeptoren, der Wachstumsfaktor HER2/ERBB2) auf dem Primärtumor (Metastase) oder anderer Risikofaktoren bewertet [3]. Der Primärtumor steht jedoch für eine Analyse nur zu Beginn der Erkrankung zur Verfügung, und die Metastase ist für eine Biopsie oft schwer erreichbar. Tumoren gelten außerdem als sehr heterogen, sodass eine Biopsie möglicherweise nur einen Ausschnitt der Erkrankung abbildet, aggressivere Subklone jedoch nicht erfasst werden. Die weitere Problematik besteht darin, dass die Zellen der Metastasen aufgrund ständiger Veränderungen oft kaum noch Ähnlichkeit mit denen des Primärtumors haben. Somit setzt man auf das Blut als Liquid Biopsy, um

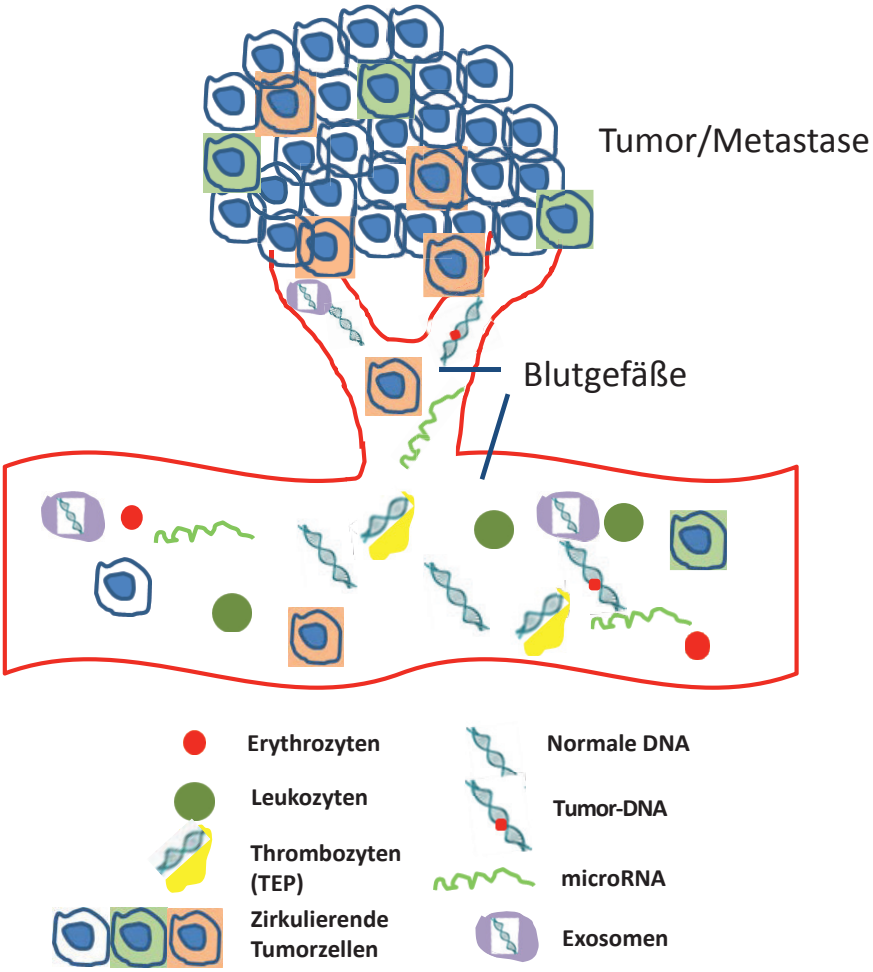

Abb. 1 | *Modell der Liquid Biopsy*

Einzelne Tumorzellen können sich vom Tumor oder der Metastase lösen und geben, so wie der Tumor/die Metastase selbst, aktiv oder durch Apoptose/Nekrose ihre »Zellinhalte« in das Blut ab. Neben gesunden Zellen und ihrer Fragmente beinhaltet das Blut dann Tumorzellen, »Tumor Educated Platelets« (TEP), tumorassoziierte Fragmente, wie Tumor-DNA, microRNAs und Vesikel (z. B. Exosomen)

wünschenswerterweise gleich zu Beginn der Erkrankung Informationen der sogenannten minimalen Tumorresterkrankung nach Operation und/oder Therapie zu erhalten, um diese dann auch im Verlauf zu kontrollieren und gegebenenfalls zu therapieren, bevor sich eine Metastasierung manifestiert. In der metastasierten Situation ist das Ziel, Resistenzen gegenüber der gegebenen Therapie schnell zu erkennen, um therapeutisch zu intervenieren. Weiterhin spiegelt das Blut das Gesamtbild der Erkrankung wider, eine sogenannte »Real Time Biopsy«, indem es Zellen vereinigt, die aus unterschiedlichen sekundären Organen rezirkuliert sind und die die aktuelle Heterogenität der Erkrankung aufzeigen [1, 4].

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) als Liquid Biopsy – Was wissen wir?

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) sind Zellen, die sich schon frühzeitig vom Tumor gelöst haben und das Potential haben, über das Blut in sekundäre Organe einzuwandern, wo sie über Jahre inaktiv verweilen können, um letztendlich später im Sekundärorgan oder aber auch nach Rezirkulation in einem anderen Organ eine Metastase zu bilden. Die Publikationen zu CTCs sind in den letzten 10 Jahren exponentiell gestiegen, sodass im Rahmen einer Liquid Biopsy hier die meisten Informationen zur Verfügung stehen. Die Präsenz und Persistenz dieser Zellen sowie ihre prognostische Bedeutung im Hinblick auf das verkürzte progressionsfreie Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) konnte bereits in zahlreichen klinischen Studien durch die Analyse mehrerer tausend Blutproben von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Mammakarzinom eindrucksvoll belegt werden [5]. Auch einige Charakteristika dieser Zellen sind bereits identifiziert worden. Neben epithelialen, EpCAM-positiven CTCs befinden sich in der heterogenen Population der CTCs auch stammzellähnliche Zellen sowie Zellen, die ihren epithelialen Charakter verloren haben und sich in mesenchymale Zellen umgewandelt haben, was man als Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet [6–9]. Weiterhin zeigen die CTCs im Vergleich zum Primärtumor (Metastase) gerade im Hinblick auf die sogenannten prädiktiven Marker (Hormonrezeptoren, ERBB2) eine diskordante Expression sowie Resistenzmarker [9, 10].

Diese bisher vorhandenen Informationen sind durch unterschiedliche Nachweisverfahren evaluiert worden, die alle Vor- und Nachteile beherbergen, was eine Standardisierung vermutlich in der Zukunft erschwert. Da im Allgemeinen 10 ml Blut für die Analyse von CTCs zur Verfügung stehen und die Frequenz dieser Zellen gerade in der Primärsituation sehr gering ist, wurden CTC-Anreicherungsverfahren entwickelt, um diese Zellen nach Selektion in erster Linie bildgebend oder molekularbiologisch zu detektieren. Mittlerweile gibt es mehr als 40 Methoden, um CTCs im Blut zu selektieren bzw. anzureichern. Die Tumorzellanreicherung berücksichtigt unterschiedliche Parameter, wie z. B. physikalische Eigenschaften (Größe, Dichte, elektrische Ladung, Deformabilität) sowie biologische Eigenschaften (Expression der Oberflächenproteine) dieser Zellen. Selbst eine In-vivo-Methode, der GILUPI CellCollector® Nanodetektor, der es mit einer antikörperbeschichteten Braunüle in der Armvene für 30 Minuten ermöglicht, mit 1.500 ml Blut eine Anreicherung der CTCs durchzuführen, wird momentan ausgetestet. Unter den Nachweisverfahren hat bisher nur das CellSearch®-System von der FDA (Food and Drug Administration) im Jahre 2004 eine Zulassung erhalten, jedoch selektiert dieses System nur epitheliale, EpCAM-positive Zellen, CTCs in EMT oder andere Eigenschaften werden nicht erfasst [1, 11, 12]. Immer mehr im Vormarsch sind sensitive, molekulare Analysen bis hin zur Einzelzellcharakterisierung. Sie basieren auf der RNA-Analyse lebender Tumorzellen und anschließender Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) Amplifikation von tumor- und epithelspezifischen Markern. Besonders durch die Flexibilität der Multiplex-Untersuchungen kann eine größere Anzahl von tumorassoziierten Markern gleichzeitig bestimmt werden. Die PCR birgt jedoch auch ihre Risiken und erfordert ein exakt evaluiertes analytisches Vorgehen, da eine unterschiedliche Anzahl von Transkripten ebenfalls von anderen Zellen exprimiert werden kann; insbesondere mitselektierte Leukozyten stellen hier ein Problem dar [7].

CTCs als prädiktive Biomarker

ERBB2 auf dem Primärtumor ist eines der prominentesten Ziele für die Anti-ERBB2-Systemtherapie. Unabhängig von der genutzten Nachweismethode konnten viele Arbeitsgruppen jedoch die Präsenz ERBB2-positiver CTCs in Patientinnen mit ERBB2-negativen Primärtumoren nachweisen. Interessanterweise zeigt auch die Gruppe der triple-negativen Patientinnen (primär und metastasiert) einen nicht unerheblichen prozentualen Anteil an ERBB2-positiven CTCs, sowohl vor als auch nach adjuvanter Therapie [13]. Somit könnten vermutlich eine Reihe weiterer Patientinnen von einer solchen Systemthera-

pie profitieren. Eine griechische Arbeitsgruppe konnte schon 2012 eindrucksvoll zeigen, dass Patientinnen mit chemoresistenten CTCs durch eine zusätzliche »adjuvante Sekundärtherapie« mit Trastuzumab, im Vergleich zur Beobachtungskohorte ohne Therapie, ein signifikant reduziertes Rezidivrisiko und verlängertes PFS hatten. Weiterhin reduzierte sich die Anzahl an Patientinnen mit detektierbaren CTCs [14]. Aufgrund dieser vermehrt gezeigten Befunde überprüfen nun klinische Studien in Deutschland und Europa sowohl in der Primärsituation als auch bei metastasierten Patientinnen, ob der ERBB2-Status auf CTCs als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf ERBB2 gerichtete Therapien gesehen werden kann. So testet die deutsche, momentan laufende DETECT-III(NCT01619111)-Studie den Effekt von Lapatinib in ERBB2-negativen, aber ERBB2-CTC-positiven, metastasierten Patientinnen. Ein ähnliches Format hatte die 2012 publizierte PESTRIN-BREAST-Studie mit 7/96 ERBB2-CTC-positiv gefundenen Patientinnen, diese jedoch ohne objektives Ansprechen. Ein negatives Fazit mit nicht genügend messbaren Ansprechraten wurde ebenfalls für die NCT01185509-BREAST-Studie, Trastuzumab in Kombination mit Vinorlebine für ERBB2-negative, ERBB2-CTC-positive metastasierte Patientinnen) gefunden. Die Rekrutierung der Patientinnen im Rahmen der CTC-TREAT(NCT01548677)-Studie (Trastuzumab nach adjuvanter/neoadjuvanter Therapie bei CTC-Positivität) zeigte jedoch, dass Trastuzumab nicht in der Lage war, die Detektionsrate von CTCs zu reduzieren [15]. Einen neuen Ansatz zeigt die noch laufende CirCe-T-DM1-Studie, die bei metastasierten Patientinnen mit ERBB2 amplifizierten CTCs Trastuzumab in Kombination mit T-DM1 testet. Erfolgreicher zeigte sich Lapatinib in der Eliminierung EGFR-positiver CTCs sowie Zytokeratin-positiver CTCs mit einer Reduktion der CTCs um 77 % bei letzterer Studie [5].

Die aufgeführten, interessanten Studienansätze mit unterschiedlichen Studienergebnissen beruhen jedoch auf Verwendung unterschiedlicher Methoden, von CellSearch® über Molekularbiologie bis hin zum Immnoassay, was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. Mit unserem heutigen Wissen über CTCs wird eine Standardisierung der Methodik sicherlich schwer, eine Kombination aus Methoden vielleicht erfolgreicher.

Ein anderes Beispiel für CTCs als prädiktiver Marker ist der Östrogenrezeptor, in hohem Maße präsent auf Primärtumor und Metastase, sodass 70–80 % der Patientinnen endokrin behandelt werden. Auch hier, ähnlich wie für ERBB2 beschrieben, ist dieser Rezeptor nur auf wenigen CTCs präsent, was einen potentiellen Resistenzmechanismus darstellen kann [9, 16, 17]. Jedoch verdichtet sich die Datenlage, dass die Analyse zirkulierender DNA hier mehr Aufschluss geben könnte [18].

Vielfach für die Tumorprogression und Resistenzbildung gegen endokrine und gegen ERBB2 gerichtete Therapien beim Mammakarzinom untersucht sind Mutationen im Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg (PI3K). Die PI3K-Untereinheit p110-alpha, codiert durch das Gen *PIK3CA*, liegt bei 30 % der Mammakarzinome mutiert vor. *PIK3CA*-Mutationsanalysen wurden beim Mammakarzinom an einzelnen CTCs und CTC-»Pools« bereits erfolgreich durchgeführt, aber auch hier zeigen klinische Studien spannende Ergebnisse im Hinblick auf Analysen in der ctDNA (»circulating tumor DNA«, ctDNA) [18].

Zirkulierende DNA – ein weiterer Biomarker?

Neben der Tumor-DNA aus CTCs gibt es auch die sogenannte zellfreie DNA (»cell-free DNA«, cfDNA). Dazu zählt die zirkulierende Tumor-(ct) DNA, aber auch DNA-Fragmente von normalen Zellen, präsent durch Apoptose, Nekrose, entzündliche Prozesse oder Immunreaktionen. Tumorspezifische Aberrationen, wie Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen, Mikrosatelliteninstabilität und DNA-Methylierung, wurden bereits im Blut detektiert und gaben einen konkreten Hinweis, dass DNA von Tumoren oder Tumorzellen in die Zirkulation gegeben wird. Somit findet man in der onkologischen Situation eine Mischung aus cfDNA und ctDNA, wobei es

zunächst nicht möglich ist, den Anteil an ctDNA zu bestimmen. Dieser Anteil variiert aber auch abhängig vom Tumorstadium und der jeweiligen Tumorentität. Während beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom in bis zu 100 % der Fälle ctDNA gefunden wird, liegt z. B. bei metastasierten urologischen Tumorerkrankungen die Ausbeute bei nur 40 %. In der Primärsituation vieler solider Tumoren ist die Nachweisrate wesentlich geringer. Diskutiert wird auch immer wieder die Herkunft der DNA. Einerseits wird spekuliert, dass cfDNA passiv durch Apoptose oder Nekrose in das Blut abgegeben wird und entsprechend dem Anteil an Tumor/Tumorzellen ctDNA freigesetzt wird. Andere Vermutungen legen nahe, dass CTCs ihre DNA absondern oder aber cfDNA von Makrophagen, die ctDNA von nekrotischen Tumorzellen aufgenommen haben, in das Blut sezerniert wird. Hier ergibt sich schon die erste Problematik. Es ist schwer zu verstehen, warum gerade die genetische Information von abgestorbenen Zellen geeignet sein soll, den weiteren Verlauf der Erkrankung einzuschätzen oder Informationen über Resistenzen zu erhalten [19-21].

Bei der Analyse der ctDNA ist jedoch nicht unbedingt die nachweisbare Menge relevant, sondern der Anteil veränderter, mutierter ctDNA. Wie schon für CTCs beschrieben, ist auch hier eine präzise Analytik notwendig, um keine falsch-positiven Ergebnisse zu erhalten. DNA hat im Blut eine Halbwertszeit von 1–2 Stunden, ist also schnell fragmentiert, sodass die Präanalytik eine entscheidende Rolle spielt. Entscheidend sind schon die Abnahmeröhrchen, um eine Adsorption der cfDNA an Plastikoberflächen zu verhindern. Je länger eine Blutprobe unbearbeitet ist, desto mehr Zellen zerfallen und setzen ihre genomische DNA frei, was die Isolation der ctDNA erschwert. Für die Analyse der ctDNA empfehlen die meisten Arbeitsgruppen die Isolation aus Plasma, obwohl der Anteil an ctDNA im Serum 2–24x höher ist. Grund für die Bevorzugung von Plasma sind die Kontamination mit anderen Zellen bei der Gerinnung unter Verwendung von Serum und die geringere Konzentration von Wildtyp-DNA im Plasma, was gerade für die nachfolgenden molekularbiologischen Analysen entscheidend ist. Für die Selektion der ctDNA aus Plasma ist auch eine Reihe von Isolationsmethoden beschrieben, wobei es auch hier keine Standardmethode gibt. Um dann die winzigen Abschnitte des mutierten Erbmaterials von Tumorzellen im Blut nachzuweisen, sind eine Reihe sensitiver Verfahren etabliert worden. Dabei werden Einzelereignisse gemessen, die verstärkt werden müssen, was durch digitale PCR-Verfahren, wie der sogenannten BEAMing-PCR (beads, emulsion, amplification, magnetics), eine Kombination von digitaler PCR und Durchflusszytometrie, der ddPCR (digital droplet) oder der DNA-Sequenzierung durch NGS (Next Generation Sequencing) erreicht wird. Theoretisch sind diese Verfahren in der Lage, Mutationen mit Frequenzen unter 1 % nachzuweisen, was sich jedoch praktisch häufig als schwierig herausstellt [22].

Zirkulierende DNA – Klinische Erfahrungen beim Mammakarzinom

Generell unterscheiden wir den sogenannten »untargeted approach« vom »targeted approach«. Ersterer wurde schon in der Primärsituation des Mammakarzinoms im Hinblick auf den prädiktiven Wert der ctDNA-Analyse eindrucksvoll gezeigt. So wurde zunächst der Primärtumor biopsiert und sequenziert, um sogenannte »Driver«-Mutationen zu finden, die dann seriell in den Plasmaproben vor und nach Therapie sowie im Verlauf der Erkrankung an der ctDNA untersucht wurden. Interessanterweise korrelierte nicht die zu Beginn der Erkrankung detektierte ctDNA mit dem signifikant verkürzten PFS, sondern die nach Therapie und OP gefundene. Am Beispiel einer Patientin konnte gezeigt werden, dass tumorgenomische Veränderungen im Plasma 13 Monate vor radiologischer Verifizierung der Metastase erkannt wurden [23].

Auch vielfach für die Tumorprogression und Resistenzbildung gegen endokrine und gegen ERBB2 gerichtete Therapien beim Mammakarzinom untersucht sind Mutationen im PI3K-Signalweg, was den sogenannten »targeted approach« darstellt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte eindrucksvoll, dass 23 % der Serumproben von primären, ER-positiven Mammakarzinompa-

tientinnen mit *PIK3CA*-Mutationen ebenfalls Mutationen in der ctDNA aufwiesen, was ein signifikanter und unabhängiger prognostischer Faktor im Hinblick auf ein Rezidiv war [24]. Der Nachweis der *PIK3CA*-Mutationen in der ctDNA von metastasierten Mammakarzinompatientinnen ist ebenfalls gelungen, und eine Reihe von Therapeutika ist hier momentan zielgerichtet im Einsatz. Ein bekanntes Beispiel ist der *PIK3CA*-Inhibitor Buparlisib, getestet in der Therapie des hormonrezeptorpositiven, HER2/neu-negativen, lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinoms der BELLE-Studien (Buparlisib brEast cancer cLinicaL Evolution), einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Phase-III-Studie mit Buparlisib in Kombination mit Fulvestrant. Buparlisib ist in der Lage, alle mutierten *PIK3CA*-Isoformen anzugreifen, und Patientinnen mit mutierter *PIK3CA*-ctDNA profitierten im Hinblick auf das verlängerte PFS signifikant von einer Kombinationstherapie im Vergleich zu Fulvestrant alleine [25, 26].

Aber auch bei den schon bereits erwähnten prädiktiven Markern des Mammakarzinoms gibt es interessante Ansätze. Einer ist die Analyse des Östrogenrezeptors, auf vielen CTCs nicht exprimiert. Was kann ctDNA hier leisten? Mutationen im Östrogenrezeptor werden bei etwa 20 % der Metastasenbiopsien von Mammakarzinompatientinnen detektiert, und diese Mutationen fand man auch schon in der ctDNA, wobei der Nachweis mit der Resistenz gegenüber der endokrinen Therapie assoziiert war. Somit bietet das Plasma hier die Möglichkeit, ergänzend zur Analyse in Biopsien möglicherweise Mutationen zu detektieren, die bei einer einzelnen Tumorbiopsie nicht nachweisbar wären. Eine Reihe von Studien untersucht momentan die Wertigkeit der ctDNA als Biomarker zur Therapiestratifizierung beim frühen, fortgeschrittenen und metastasierten Mammakarzinom [27].

Eine 2012 veröffentlichte Studie mit Vergleichsanalyse von Tumorgewebe und der ctDNA beim primären Mammakarzinom zeigte eindrucksvoll die Wertigkeit der ctDNA, auch die sogenannte »tumor cell dormancy« zu verfolgen. Fokale DNA-Amplifikationen von Genen mit onkologischem Potenzial wurden sowohl im Gewebe als auch im Plasma detektiert. Interessanterweise konnte man diese Amplifikationen noch 12 Jahre nach Erstdiagnose in einigen Plasmaproben finden, was auf eine okkulte Mikrometastasierung hinweist [28].

Zirkulierende Vesikel und Thrombozyten – Weitere Kandidaten auf dem Vormarsch

Neben CTCs und ctDNA werden aber auch andere Komponenten im Plasma als geeignete Biomarker angesehen, die das Feld insgesamt nicht nur komplexer, sondern auch komplizierter gestalten. Hierzu gehören die sogenannten Exosomen und Ektosomen, membranumhüllte Vesikel, die vor allem auch von Tumorzellen abgeschnürt werden und ein ganzes Potpourrie an Markern enthalten (Proteine, Lipide, DNAs, RNAs). Es wird spekuliert, dass diese Vesikel eine Art Transportsystem zwischen verschiedenen Zellen darstellen, um gegebenenfalls andere, auch gesunde Zellen, mit Charakteristika der Tumorzellen zu bestücken. Sie werden weiterhin mit der Metastasierung, Angiogenese und Proliferation in Verbindung gebracht. Exosomen sind in relativ großer Menge im Blut vorhanden und gelten als stabil, wobei methodisch noch einige Hürden bezüglich ihrer Isolation zu überwinden sind. Mit ihrer Charakterisierung versucht man, Oberflächenproteine zu finden, mit deren Hilfe man die Vesikel dann aus dem Blut selektieren kann [29]. In einer aktuellen Publikation konnte unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem an unserer Uniklinik ansässigen Institut für Transfusionsmedizin zeigen, dass die Konzentration extrazellulärer Vesikel bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Mammakarzinom 40-fach höher ist als bei gesunden Probandinnen und erhöhte Konzentrationen nach Abschluss der neoadjuvanten Therapie signifikant mit einem verkürzten 3-Jahres-PFS und OS assoziiert waren. Interessanterweise korrelierte eine geringe Konzentration an Vesikeln nach Therapie mit der Präsenz von CTCs mit Stammzell- oder Resistenzcharakter, was unterstreicht, dass die gleichzeitige Analyse unterschiedlicher Biomarker und

die Charakterisierung der jeweiligen Analyten entscheidend ist [30]. In einer unserer aktuellen Studien zum metastasierten Mammakarzinom können wir in diesem Zusammenhang belegen, dass der Informationsgehalt der CTCs mit dem der Vesikel nur minimal übereinstimmt [31].

Erstaunlicherweise interagieren auch Thrombozyten mit Tumorzellen, wobei es bei Kontaktaufnahme beider Zelltypen zum Austausch von tumorassoziierten Molekülen kommt. Diese Thrombozyten nennt man auch »tumor educated platelets« (TEP), in etwa: vom Tumor ausgebildete Thrombozyten. Somit können selbst Thrombozyten tumorgenetisches Material beinhalten und zur näheren Liquid-Biopsy-Analyse hinzugezogen werden [32].

Fazit

Ja, die Liquid Biopsy wird die Zukunft sein. Sie ist wesentlich leichter durchführbar als das Biopsieren von Tumor oder Metastase, was momentan noch als Standard gilt. Aber auch aus ethischen und ökonomischen Aspekten wird sich die Liquid Biopsy als ein fester Bestandteil in der Diagnostik etablieren. Einerseits werden Kosten gespart, andererseits könnte zu jedem gewünschten Zeitpunkt die Wirkungsweise von Medikamenten überprüft und angepasst werden und jene Patientin in der Primärsituation identifiziert werden, die ein erhöhtes Rezidivrisiko hat. Sicherlich muss man die Liquid Biopsy momentan aber auch erst einmal als Ergänzung zur klassischen Gewebeanalyse ansehen, die histomorphologisch und molekularpathologisch sichere Ergebnisse für die Patientinnen erzielt. Ihr Nachteil, die mangelnde Repräsentanz der heterogenen Tumorsituation, kann durch komplementäre Analyse der hoch präsenten Liquid Biopsy ausgeglichen werden, die die meisten genetischen Informationen von Primärtumor und Metastasen beinhaltet. Eine Reihe von Studien vergleicht die Markerexpression im Gewebe mit der in der Liquid Biopsy, wobei bei letzterer Methode momentan die einzelnen Analyten miteinander in ihrer Aussagekraft verglichen werden. Unser Wissen über CTCs unterstreicht, dass die Analyse dieser Zellen auf RNA-, DNA- und Proteinebene uns helfen wird, den Weg der Metastasierung und die Resistenzentwicklung zu verstehen. Diese Möglichkeiten zeigen auch den momentanen Vorteil von CTCs gegenüber anderen Biomarkern, besonders der zirkulierenden DNA, da mit CTCs alle sogenannten »-omic«-Untersuchungen durchgeführt werden können (Genomics, Transcriptomics, Proteomics). So bieten sich gerade CTCs aber auch für funktionelle Untersuchungen an, was durch von Patientinnen generierte Zelllinien und Xenograft-Modelle schon erfolgreich gezeigt werden konnte [1]. Im Rahmen der immer mehr im Fokus stehenden zielgerichteten Behandlung von Tumorpatientinnen bietet sich ctDNA für die Analyse von Mutationen an, für die bereits zielgerichtete Therapien existieren. Eine Reihe interessanter Proof of Principle-Studien hat die Aussagekraft der CTCs schon mit den Ergebnissen der ctDNA verglichen, wobei diese Aussagen noch in großen klinischen Studien validiert werden müssen [33].

Um in der Zukunft durch die Liquid-Biopsy-Therapie relevante Entscheidungen zu treffen, müssen noch viele Aspekte geklärt und gerade methodische Hürden überwunden werden. In diesem Zusammenhang spielt die Präanalytik eine entscheidende Rolle. Wieviel Zeit darf zwischen Blutentnahme und -analyse vergehen? Wie werden Proben asserviert, welches Antikoagulanz wird gewählt? Können wir einen Standard definieren, um Ergebnisse vergleichbar zu machen? Bezüglich der Analyten stellt sich die Frage: Welches ist der richtige Analyt, CTCs oder eher eines ihrer Fragmente oder eine Kombination aus mehreren Parametern? Welche CTCs sind maligne, welche haben das Potenzial, in sekundäre Organe einzuwandern, wie identifiziert man gerade in der Primärsituation ihre geringe Frequenz? Wie »tief« muss ich sequenzieren, um auch Mutationsfrequenzen $<1\%$ nachzuweisen? Haben diese Mutationen eine Bedeutung? Generell ist die Frage zu klären, inwieweit die ctDNA von toten Zellen tatsächlich den resistenten Klon widerspiegelt. Nicht zu vergessen, dass Menschen mit zunehmendem Alter auch mehr Mutationen in ihren Zellen entwickeln. Die meisten Mutationen sind hier ohne Bedeutung,

da die Zellen vom Körper eliminiert werden und keine Tumorerkrankung generieren. Im Rahmen eines Tumorscreenings zur Früherkennung von Tumorerkrankungen oder deren Beobachtung im Verlauf könnten derartige Untersuchungen jedoch falsch-positive Ergebnisse generieren.

Zahlreiche Tests zur Verwendung der Liquid Biopsy für Tumortherapien sind in der Entwicklung, wobei sich die gesamte Analytik bisher noch im Bereich der Forschung befindet und in Studienansätzen gewissenhaft validiert werden sollte. Dabei sind gerade in der metastasierten Situation Fortschritte gemacht worden, eine Herausforderung bleibt die primäre Situation mit geringer Tumorlast.

Fazit für die Praxis

Die Möglichkeiten einer Liquid Biopsy sind vielseitig und nicht alleine auf die Untersuchungen von Blut beschränkt. In Form der cfDNA-Analyse und dem Nachweis sowie der Charakterisierung der CTCs bietet die Liquid Biopsy in Zukunft in Kombination mit der klassischen Gewebebiopsie eine komplementäre Möglichkeit, die Behandlung von Tumorpatientinnen (Patienten) zu optimieren. Allerdings wird es noch eine Zeit andauern, bis diese Ansätze in der Routine Anwendung finden. Zunächst müssen die Methoden standardisiert werden, und auch die momentan noch zu hohen Kosten sollten sich in einem vertretbaren Rahmen befinden. Auch wenn noch einige Fragen offen sind, sollte man jedoch nicht zögern, Patientinnen und Patienten die Möglichkeit zur Teilnahme an klinischen Studien anzubieten, die die Analyse einer Liquid Biopsy im Rahmen einer zielgerichteten Therapie einbeziehen, um die Wertigkeit dieser Bestimmungen für die Patientinnen/Patienten zu beurteilen.

Zusammenfassung

Um eine Tumorerkrankung zu diagnostizieren und die optimale Therapie zu evaluieren, werden die sogenannten prädiktiven Faktoren einer Tumorentität histopathologisch und molekularpathologisch untersucht. Der Primärtumor steht jedoch für eine Analyse nur zu Beginn der Erkrankung zur Verfügung, und die Metastase ist für eine Biopsie oft schwer erreichbar. Tumoren gelten außerdem als sehr heterogen, sodass eine Biopsie möglicherweise nur einen Ausschnitt der Erkrankung abbildet, aggressivere Subklone jedoch nicht erfasst werden. Somit besteht der Wunsch, aus einer sogenannten Liquid Biopsy (Flüssigkeitsbiopsie), insbesondere aus Blut, Erkenntnisse über das jeweilige Krankheitsbild zu gewinnen. Nicht nur die Früherkennung von Tumoren, sondern auch die Abschätzung des Metastasierungsrisikos, die Identifizierung therapeutischer Zielstrukturen und Resistenzmechanismen sowie das Tumor-Monitoring soll hiermit gewährleistet werden. Unter Liquid Biopsy versteht man die Analyse tumorabgeleiteter Nukleinsäuren im Blut, entweder in Form von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) zellulär gebunden oder frei in Form zellfreier Tumor-DNA, oder aber auch in Form sehr kleiner Vesikel (Exosomen).

Bevor diese Art der Diagnostik in die Klinik Einzug hält, müssen jedoch noch methodische Hürden überwunden werden, insbesondere die Standardisierung der unterschiedlichen Testsysteme, da gerade in der Primärsituation CTCs und Tumor-DNA nur in kleinsten Mengen vorkommen, was eine große Herausforderung an die Methodik darstellt. Auch wenn die Integration von CTCs und zirkulierender DNA in klinische Studien, insbesondere beim Mammakarzinom, schon stattgefunden hat, sind noch viele Interventionsstudien mit hohen Patientenzahlen notwendig, um die Liquid Biopsy für die personalisierte Medizin zu nutzen.

Kasimir-Bauer S:
Circulating tumor cells and what they release:
Are liquid biopsies the future?

Summary: Cancer patients are usually treated according to the so-called predictive markers on their primary tumors. However, these markers can change during the molecular evolution of distant

metastases, finally leading to death. Primary tumor tissue is only available at the time of first diagnosis and metastatic tissue is often difficult to obtain. Even if accessible, a single tumor biopsy is mostly a single snapshot in time and does not always mirror the characteristics of the disease, mostly due to the known heterogeneity of individual lesions. In this regard, the use of biological fluids such as blood as a minimally invasive method to obtain cell and nucleic acid biomarkers would be an ideal »surrogate tissue« to identify and monitor prognostic and predictive factors that will help in selecting the optimal therapeutic strategy for each individual patient. The analysis of circulating tumor cells (CTCs) or their products, e. g. circulating DNA, microRNAs as well as extracellular vesicles, has been discussed to reflect all subclones present at a certain time point of the disease which allows rapid and repeated sampling and sequential monitoring of treatment response and disease progression, enabling for earlier intervention and treatment management in the follow-up of disease evolution. However, the analysis of blood-based biomarkers for routine clinical use is still facing serious challenges since standardised methods with regard to specificity and sensitivity are lacking. Although CTCs and circulating DNA have already been implemented in clinical studies, especially breast cancer, further studies including high patient numbers are needed to implement liquid biopsy into personalised medicine.

Keywords: liquid biopsy – circulating tumor cells – circulating DNA – extracellular vesicles

Literatur

1. Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. Oncol Res Treat 2017; 40: 404–408.

2. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Hrsg. Berlin: 2015.

3. AGO Breast Committee August 22, 2016. (http://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/). Zugegriffen: 10.09.2019.

4. Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, Coticchia C, Skog J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. Transl Cancer Res 2015; 4: 280–290.

5. Cabel L, Proudhon C, Gortais H, Loirat D, Coussy F, Pierga JY, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. Int J Clin Oncol 2017; 22: 421–430.

6. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res 2009; 11: R46.

7. Lianidou ES. Molecular characterization of circulating tumor cells: Holy Grail for personalized cancer treatment? Clin Chem 2014; 60: 1249–1251.

8. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. Breast Cancer Res 2012; 14: R15.

9. Kasimir-Bauer S, Bittner AK, König L, Reiter K, Keller T, Kimmig R, et al. Does primary neoadjuvant systemic therapy eradicate minimal residual disease? Analysis of disseminated and circulating tumor cells before and after therapy. Breast Cancer Res 2016; 18: 20.

10. Aktas B, Kasimir-Bauer S, Müller V, Janni W, Fehm T, Wallwiener D, et al. Comparison of the HER2, estrogen and progesterone receptor expression profile of primary tumor, metastases and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. BMC Cancer 2016; 16: 522.

11. Lianidou ES. Circulating tumor cell isolation: A marathon race worth running. Clin Chem 2014; 60: 287–289.

12. Alix-Panabières C, Mader S, Pantel K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. J Mol Med 2017; 95: 133–142.

13. Agelaki S, Dragolia M, Markonanolaki H, Alkahtani S, Stournaras C, Georgoulias V, et al. Phenotypic characterization of circulating tumor cells in triple negative breast cancer patients. Oncotarget 2017; 8: 5309–5322.

14. Georgoulias V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. Ann Oncol 2012; 23: 1744–1750.

15. Ignatiadis M, Litière S, Rothe F, Riethdorf S, Proudhon C, Fehm T,et al. Trastuzumab versus observation for HER2 nonamplified early breast cancer with circulating tumor cells (EORTC 90091-10093, BIG 1-12, Treat CTC): a randomized phase II trial. Ann Oncol 2018; 29: 1777–1783.

16. Babayan A, Hannemann J, Spötter J, Müller V, Pantel K, Joosse SA. Heterogeneity of estrogen receptor expression in

circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. PLoS One 2013; 8: e75038.
17. Aktas B, Müller V, Tewes M, Zeitz J, Kasimir-Bauer S, Loehberg CR, et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor status of circulating tumor cells and the primary tumor in metastatic breast cancer patients. Gynecol Oncol 2011; 122: 356–360.
18. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). Cancer Cell 2017; 31: 172–179.
19. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards mplementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer 2017; 17: 223–238.
20. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. BMC Med 2017; 15: 75.
21. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. Nat Rev Genet 2019; 20: 71–88.
22. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. Oncotarget 2017; 9: 2912–2922.
23. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. Sci Transl Med 2015; 7: 302ra133.
24. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, et al. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2015; 150: 299–307.
25. Geuna E, Milani A, Martinello R, Aversa C, Valabrega G, Scaltriti M, et al. Buparlisib, an oral pan-PI3K inhibitor for the treatment of breast cancer. Expert Opin Investig Drugs 2015; 24: 421–431.
26. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Greil R. SABCS 2016: systemic therapy for metastatic breast cancer. Memo 2017; 10: 86–89.
27. Appierto V, Di Cosimo S, Reduzzi C, Pala V, Cappelletti V, Daidone MG. How to study and overcome tumor heterogeneity with circulating biomarkers: The breast cancer case. Semin Cancer Biol 2017; 44: 106–116.
28. Shaw JA, Page K, Blighe K, Hava N, Guttery D, Ward B, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. Genome Res 2012; 22: 220–231.
29. Taverna S, Giallombardo M, Gil-Bazo I, Carreca AP, Castiglia M, Chacártegui J, et al. Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patients: critical analysis of evidence and potential role in clinical practice. Oncotarget 2016; 7: 28748–28760.
30. König L, Kasimir-Bauer S, Bittner AK, Hoffmann O, Wagner B, Santos Manvailer LF, et al. Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. Oncoimmunology 2017; 7: e1376153.
31. Keup C, Mach P, Aktas B, Tewes M, Kolberg HC, Hauch S, et al. RNA Profiles of Circulating Tumor Cells and Extracellular Vesicles for Therapy Stratification of Metastatic Breast Cancer Patients. Clin Chem 2018; 64: 1054–1062.
32. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. Cancer Cell 2015; 28: 666–676.
33. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. Cancer Discov 2016; 6: 479–491.

Interessenkonflikt: Die Autorin erklärt, dass Verbindungen zur Firma *QIAGEN* in Form eines Beratervertrages bestehen.

Prof. Dr. Sabine Kasimir-Bauer
Wissenschaftliches Labor
Universitätsklinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe
Hufelandstraße 55
45147 Essen

sabine.kasimir-bauer@uk-essen.de