Zirkulierende Tumorzellen: Multikulturell, manipulativ und häufig in Begleitung – Gibt es neue Perspektiven?

S. Kasimir-Bauer

Immer mehr Menschen leben mit der Diagnose Krebs, wobei Brust-und Prostatakrebs dominieren. Durch verbesserte Behandlungsmethoden steigt auch die Rate an Personen, die die Erkrankung überleben. Ein Drittel der Betroffenen lebt weiter mit der Erkrankung oder hat ein erhöhtes Risiko, einen Rückfall zu erleiden und zu versterben. Gesucht werden Biomarker – bevorzugt im Blut – um die Erkrankung besser zu verstehen, zu beobachten, früher einzugreifen und eine sogenannte personalisierte Therapie durchführen zu können. Im Fokus stehen hier einzelne Tumorzellen, die im Blut zirkulieren, aber auch ihr genetischer Inhalt wird zunehmend untersucht, um diese Fragestellungen zu klären. Im Zeitalter der Immuntherapien wird auch die Interaktion der Tumorzellen mit Zellen des Immunsystems berücksichtigt. Ein komplexes Geschehen, das therapeutisches Handeln zunehmend erschwert und im Folgenden näher beleuchtet werden soll.

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs): Ein signifikant prognostischer Marker für einen ungünstigen Krankheitsverlauf

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) sind Zellen, die sich schon frühzeitig von soliden Tumoren lösen und das Potential haben, über das Blut in sekundäre Organe einzuwandern, bevorzugt das Knochenmark, wo sie als disseminierte Tumorzellen (DTCs) bezeichnet werden. Aber längst nicht alle Zellen haben einen malignen Charakter und verursachen eine Metastasierung. Die meisten Studien sind bisher beim Mammakarzinom (Brustkrebs) durchgeführt worden, interessant deshalb, weil DTCs hier über Jahre inaktiv im Körper verweilen können, um letztendlich später im Sekundärorgan eine Metastase zu bilden [1]. Die Publikationen zu CTCs sind in den letzten Jahren exponentiell gestiegen, so dass eine Reihe von Eigenschaften dieser Zellen bereits identifiziert wurden. Diese bisher vorhandenen Informationen sind durch eine Vielzahl unterschiedlicher Nachweisverfahren evaluiert worden, die alle Vor- und Nachteile beherbergen und eine Standardisierung vermutlich erschweren, jedoch inhaltlich vergleichbare Ergebnisse gezeigt haben. Obwohl die Präsenz und Persistenz der CTCs sowie ihre prognostische Bedeutung im Hinblick auf das verkürzte progressionsfreie Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) bereits in zahlreichen klinischen Studien durch die Analyse mehrerer tausend Patientinnen und Patienten in unterschiedlichen Tumorentitäten eindrucksvoll belegt wurden, haben gerade die CTCs den Einzug in die klinische Routine in den meisten Entitäten noch nicht geschafft [2]. Die Gründe dafür sind vielschichtig und sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

CTCs: Multikulturell, manipulativ und häufig in Begleitung

Die enorme Heterogenität der CTCs ist sicherlich ein Grund, warum es so schwierig ist, sie zu erfassen, zu eliminieren und somit in den klinischen Alltag zu integrieren. Neben epithelialen, EpCAM-positiven CTCs, befinden sich in der Population der CTCs auch Stammzell-ähnliche Zellen, die sich immer wieder selbst erneuern können und nicht durch Chemo- oder Radiotherapie eliminiert werden. Einige CTCs verlieren ihren epithelialen Charakter und wandeln sich in mesenchymale Zellen um, was man als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet, wobei beide Populationen auch gleichzeitig präsent sein können [1]. Weiterhin zeigen die CTCs im Vergleich zum Primärtumor (Metastase) andere Charakteristika. Beim Mammakarzinom ist gerade im Hinblick auf die sogenannten prädiktiven Marker (Hormonrezeptor [HR], Wachstumsfaktorrezeptor [HER2]), die die Therapie bestimmen, eine diskordante Expression beschrieben worden [3]. Auch weisen einige CTCs beim Mamma-und Ovarialkarzinom schon zu Beginn der Erkrankung Resistenzmarker auf, so dass bei einem Rezidiv der Erkrankung oder unter Therapie Tumorzellen mit veränderten Eigenschaften das Tumorgeschehen dominieren und daher die gegebene Therapie nicht erfolgreich greifen kann [4, 5].

Gerade beim Mammakarzinom kann es nach 10–20 Jahren zum Rezidiv der Erkrankung kommen, wofür man eine frühe Disseminierung der Tumorzellen in sekundäre Organe wie das Knochenmark verantwortlich gemacht hat. Lange hat man sich gefragt, wie Tumorzellen es schaffen, so lange in einem für sie fremden Gewebe zu schlafen. Mittlerwei-

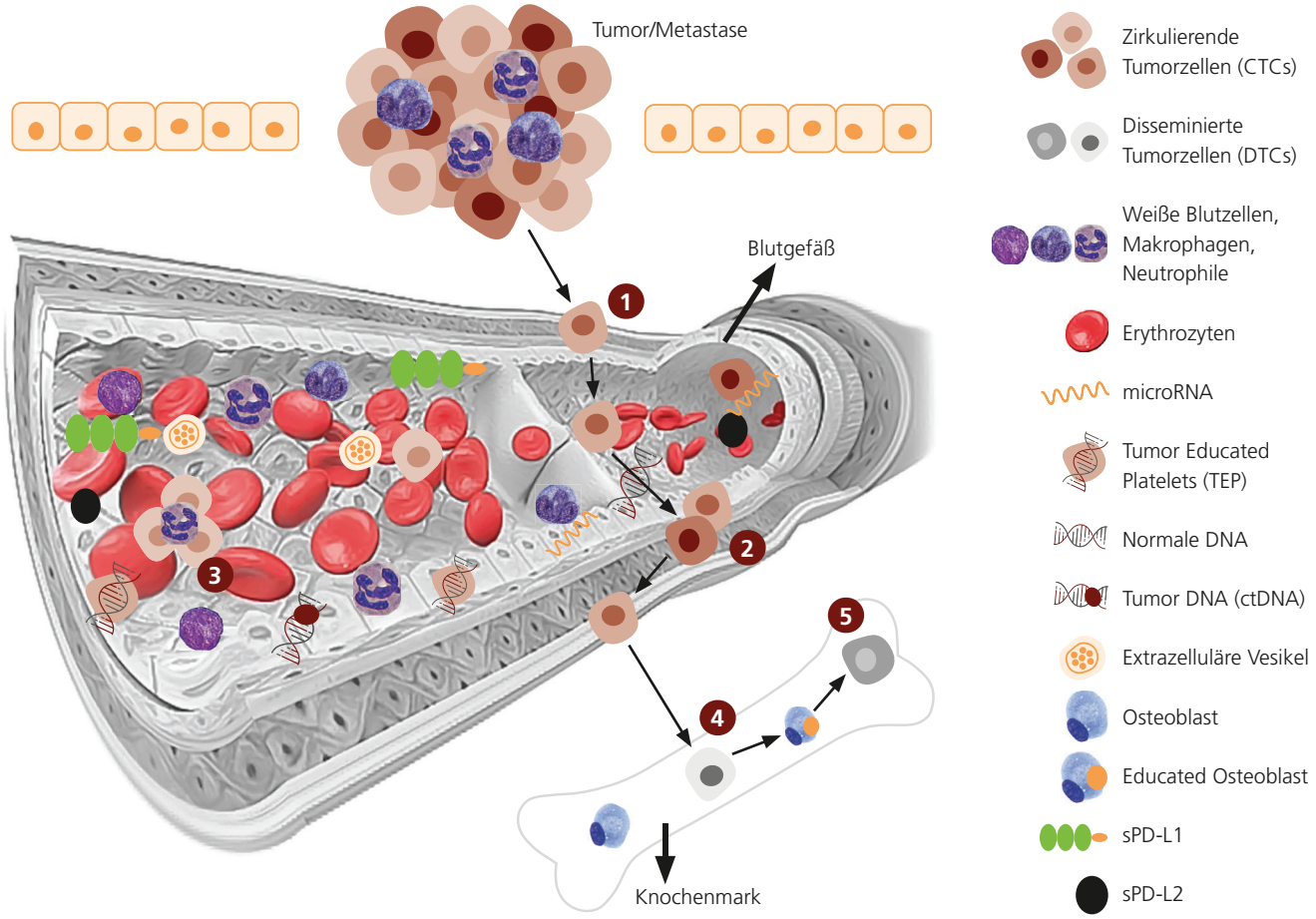

Abb. 1: Die Wege der Tumorzellen. Ein(e) Tumor (Metastase) ist sehr heterogen und besteht nicht nur aus unterschiedlichen Tumorzellen, sondern wird auch durch Zellen des Immunsystems infiltriert, die das Tumorgeschehen mitbestimmen. Einzelne Tumorzellen können sich vom Tumor oder der Metastase lösen und in die Blutbahn gelangen, wo sie als Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet werden **(1)**. Einige CTCs bilden anschließend ein Duett **(2)**, oder auch Zellverbände mit Immunzellen, gerne Neutrophilen **(3)**, um dann singulär in ein sekundäres Organ als DTC **(4)**, wie das Knochenmark, einzuwandern („Dynamic Touch and Go"). Ein Mechanismus, um in Ruhe zu schlafen, ist die Manipulation von Osteoblasten (knochenaufbauende Zellen) **(5)**. So wie der Tumor/die Metastase selbst, geben CTCs auch aktiv oder durch Apoptose/Nekrose ihre „Zellinhalte" in das Blut ab. Dazu zählen die zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA), microRNAs, in Vesikeln verpacktes Tumormaterial, aber auch Liganden (sPD-L1/2) von Tumor- und Immunzellen, die prognostisch bedeutsam sein können. Neben gesunden Zellen und ihrer Fragmente beinhaltet das Blut auch Zellen des Immunsystem, die das Tumorgeschehen beeinflussen, wie „Tumor Educated Platelets" (TEP). Abkürzungen: sPD-1: Soluble Programmed Cell Death Protein 1; sPD-L1: Soluble Programmed Cell Death Protein Ligand-1 (modif. nach medicalgraphics.de).

le konnten einige Fragen beantwortet werden. Es beginnt schon im Tumor selbst, dass Tumorzellen sich ein sogenanntes „Schlupfloch" (Tumor Microenvironment of Metastasis [TMEM]) schaffen, indem sie sich mit im Tumor befindlichen Fresszellen (Makrophagen) und Gefäßzellen verbünden, um den Gewebeverband zu verlassen, was beim Mammakarzinom mit einem erhöhten Risiko der Fernmetastasierung assoziiert war [6]. Ein ähnliches Verhalten wurde aktuell unter dem Titel „Tumor-Physik: Krebszellen verflüssigen sich und quetschen sich durchs Gewebe" durch den Leipziger Physiker Prof. Dr. Käs in Kooperation mit der Universitätsfrauenklinik in Leipzig unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Aktas publiziert. Die Autoren fanden in Tumorproben Areale mit beweglichen Zellen sowie stabile, feststoffartige Regionen ohne Zellbewegung. Aus Sicht des Physikers sollten sich Zellen nicht in einer dichten Tumormasse bewegen können, doch die Färbung menschlicher Tumorproben direkt nach der Operation mit einem Fluoreszenzfarbstoff belegte eindrucksvoll, wie sich Zellen und ihre Kerne buchstäblich durch das Gewebe quetschten, indem sie sich stark deformierten [7].

Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Tumorzellwanderungen zeigt ▶ Abbildung 1. Einmal im Sekundärorgan wie dem Knochenmark angekommen, nehmen DTCs „Erziehungsmaßnahmen" vor, um im fremden (mesenchymalen) Umfeld zu schlafen. Dabei manipulieren sie in erster Linie die sie umgebenden knochenaufbauenden Zellen

(Osteoblasten), die dann in der Fachsprache „Educated Osteoblasts" (erzogene/gebildete Osteoblasten) genannt werden und keinen schädigenden Einfluss auf die Tumorzellen mehr ausüben [8]. Seit einigen Jahren verdichten sich die Hinweise, dass CTCs selten alleine in der Blutbahn zirkulieren, sondern durch weiße Blutzellen (WBC) unterstützt werden. Eine besondere Rolle spielen hier die Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen [9]. Aufwendige Untersuchungen im Mausmodell und folgend in 70 Blutproben von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom belegten, dass die Mehrzahl der CTCs zwar singulär zirkulierte, sich jedoch ein geringer Prozentsatz im Verbund mit weißen Blutzellen befand, in erster Linie den Neutrophilen und nur zu einem geringen Anteil den Monozyten. Die Präsenz dieser WBC-CTC-Cluster assoziierten mit einem signifikant kürzeren PFS verglichen mit Patientinnen, die singuläre CTCs aufwiesen [10] Auch beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) dominieren die Neutrophilen das Immungeschehen im peripheren Blut [11]. Eine andere Hypothese postuliert, dass CTCs zunächst den Tumor singulär verlassen, jedoch einmal in der Blutbahn angekommen Ihresgleichen suchen, Paare bilden und in sekundäre Gewebe einwandern. Man spricht auch von einem „Dynamic Touch and Go", was in erster Linie bei CTCs mit Stammzellcharakter beobachtet wurde. Und auch hier sind es die Cluster, die bei über 100 untersuchten Patientinnen mit Mammakarzinom mit einem signifikant verkürzten OS assoziiert wurden [12]. Erstaunlicherweise interagieren auch Thrombozyten mit Tumorzellen, wobei es bei Kontaktaufnahme beider Zelltypen zum Austausch von tumorassoziierten Molekülen kommt. Auch hier greifen „Erziehungsmaßnahmen", denn man bezeichnet die Thrombozyten dann als „Tumor Educated Platelets" (TEP), in etwa vom Tumor ausgebildete Thrombozyten. Somit können selbst Thrombozyten tumorgenetisches Material beinhalten und zur näheren Blutanalyse hinzugezogen werden [13].

Wie soll man eine solche Vielfalt an ungünstigen Charaktereigenschaften therapieren? Unter dem Titel „Gain Fat – Lose Metastasis" wurde im Mausmodell kürzlich eine interessante Hypothese aufgestellt. CTCs in EMT sind besonders anpassungsfähig und daher ein Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen. So wurden Mäusen besonders aggressive, menschliche Mammakarzinomtumoren eingepflanzt und die Tiere mit Trametinib (Proteinkinase-Inhibitor) und Rosiglitazon (Diabetes-Medikament mit der Eigenschaft der Redifferenzierung maligner Zellen) über zwei Wochen behandelt. Mammakarzinomzellen in EMT entwickelten sich zu Fettzellen, die sich nicht im angrenzenden Gewebe ausbreiteten und somit keine weiteren Metastasen bildeten [14]. Nicht uninteressant, aber für die Klinik natürlich noch Zukunftsmusik.

CTCs als therapeutisches Ziel am Beispiel Mammakarzinom: Was haben wir gelernt?

Da die prognostische Bedeutung der CTCs unumstritten und klar definiert ist, sind in den letzten Jahren weitere Studien konzipiert worden, um gerade Patientinnen in der Primärsituation der Erkrankung zielgerichtet zu behandeln [2]. Methodisch dominiert hier das automatisierte CellSearch System, das von der FDA (Food and Drug Administration) im Jahre 2004 für die numerische Bestimmung angereicherter, EpCAM-positiver (epithelialer) Zellen eine Zulassung erhielt und im Laufe der Jahre von ausgewiesenen Arbeitsgruppen evaluiert wurde. Dabei gilt eine Patientin in der Primärsituation als CTC-positiv, wenn ≥ 1 CTC in 7,5 ml Blut detektiert werden. Das System erlaubt neben der Verifizierung einer epithelialen Zelle auch die Bestimmung eines weiteren Oberflächenmarkers. Hier ist der Wachstumsfaktorrezeptor HER2 eines der prominentesten Ziele, für den therapeutische Optionen bei Positivität des Primärtumors zur Verfügung stehen. Unabhängig von der genutzten Nachweismethode konnten viele Arbeitsgruppen die Präsenz HER2-positiver CTCs in Patientinnen mit HER2-negativen Primärtumoren nachweisen, so dass Studiengruppen in Deutschland und Europa sowohl in der Primärsituation, als auch bei metastasierten Patientinnen überprüfen, ob der HER2-Status auf CTCs als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf HER2-gerichtete Therapien angesehen werden kann [2]. Obwohl kleine Pilotstudien in den Jahren zuvor gezeigt hatten, dass Trastuzumab HER2-positive CTCs und auch DTCs eliminieren kann [15, 16], waren die Ergebnisse der Treat-CTC- und NSABP B47-Studie eher ernüchternd [2, 17]. In TREAT-CTC wurden 1.317 Patientinnen mit HER2-negativem Mammakarzinom mit kurativer Absicht eingeschlossen, wobei 95 Teilnehmerinnen ≥ 1 CTC per 15 ml Blut nach OP und (neo)adjuvanter Chemotherapie aufwiesen. 63 Patientinnen wurden in zwei Studienarme randomisiert und erhielten entweder 6 Zyklen Trastuzumab oder waren im Beobachtungsarm. Primärer Endpunkt war der prozentuale Anteil an Patientinnen mit persistierenden CTCs ≥ 1 per 15 ml in Woche 18. Die Studie wurde jedoch frühzeitig geschlossen, da 5 Patientinnen im Studienarm noch mindestens eine CTC zu diesem Zeitpunkt aufwiesen, im Vergleich dazu 4 Patientinnen im Standardarm und 76 % der Patientinnen hatten HER2-negative CTCs. Das Ergebnis wurde mit der mangelnden Effektivität von Trastuzumab bei HER2-negativen

Patientinnen erklärt, wobei es bei Studienkonzeption noch unklar war, ob HER2-negative Patientinnen von Trastuzumab profitieren könnten. Diese Ergebnisse wurden dann auch durch die Phase-III-Studie NSABP B-47/NRG bestätigt, die HER2-negative Patientinnen (HER2 FISH-negativ in der Immunohistochemie 1+ oder 2+) inkludierte [18].

Als vielversprechend galten dann die Studien mit Lapatinib. Die prospektive, multizentrische Phase-II-Studie CirCe T-DM1 hatte die Fragestellung, ob HER2-amplifizierte CTCs bei HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen nachweisbar sind und ob diese Patientinnen auf die gegebene, spezifische Anti-HER2-Therapie ansprechen. Die Studie war letztendlich auch negativ, da in dieser Gruppe von Patientinnen-CTCs mit einer HER2-Amplifikation nur eine kleine Subgruppe repräsentierten [19]. Mit großer Spannung wurden die Ergebnisse der deutschen DETECT-III (NCT01619111)-Studie erwartet, die Patientinnen mit HER2-negativem metastasierten Mammakarzinom, aber HER2-positiven CTCs in zwei Studienarme (Standardbehandlung oder Standard in Kombination mit Lapatinib) randomisierte. Obwohl sich die Eliminierung der CTCs vom Studienstart bis zur ersten Behandlungsbeobachtung nicht signifikant in den beiden Studienarmen unterschied, war diese sogenannte „Clearance Rate" der CTCs mit einem signifikant längeren Gesamtüberleben assoziiert. Interessanterweise hatte die HER2-gerichtete Therapie im Vergleich zum Standardarm einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben. Jedoch wurden durch die Hinzunahme von Lapatinib weder die Anzahl an CTCs, noch die HER2-positiven CTCs verringert [2].

Die HER2-positiven CTCs werden weiter im Fokus bleiben, da besonders Subgruppen, wie triple-negative Brustkrebspatientinnen (TNBC; keine Expression von HR und HER2) profitieren könnten. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe im letzten Jahr publizieren, dass primäre TNBC-Patientinnen einen nicht unerheblichen, prozentualen Anteil an ERBB2/ERBB3 (codierend für HER2/3) überexprimierenden CTCs sowohl vor als auch nach neoadjuvanter Therapie aufwiesen. In einer umfassenden molekularen CTC-Analyse, unter Betrachtung von 17 Genen, war die Präsenz EGFR (Epidermal-Growth-Factor-Receptor)-pos./ERBB2-pos./ERBB3-pos. CTCs vor Therapie sowie ERBB2-pos./ERBB3-pos. CTCs nach Therapie prädiktiv für ein signifikant verkürztes PFS, was in einer univariaten und multivariaten Analyse für die Familie der ERBB-Gene bestätigt wurde [20].

DE-40438/2021

LEBEN
LEBEN.

Ermöglichen Sie Patientinnen
mit metastasiertem HER2-positiven
Mammakarzinom mehr Zeit
für glückliche Momente.
Dank bahnbrechender Krebstherapie.

Daiichi-Sankyo | AstraZeneca

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von einer griechischen Arbeitsgruppe bestätigt [21]. Somit wäre eine HER2-gerichtete Therapie bei TNBC-Patientinnen mit persistierenden HER2 (ERBB2/3)-positiven CTCs ein möglicher Ansatz.

CTCs: Können wir aus anderen Tumorentitäten neue therapeutische Ziele für das Mammakarzinom ableiten?

Sicherlich repräsentieren HER2-positive CTCs nur einen Teil der heterogenen CTC-Population beim Mammakarzinom, so dass ständig neue therapeutische Ziele evaluiert werden, die therapeutisch vielleicht besser zu eliminieren sind. Gerade in der bereits genannten Hochrisikogruppe der TNBC-Patientinnen werden immer wieder neue Ansätze gesucht, um die Prognose dieser Patientinnen zu verbessern. Im Fokus steht hier der Androgenrezeptor (AR), der auch auf Mammakarzinomzellen in unterschiedlichem Maße exprimiert wird. Beim Prostatakarzinom hat gerade die CTC-Analyse dazu beigetragen, prädiktiv das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie vorherzusagen. Hier weiß man, dass nicht der AR selbst, sondern seine Varianten, insbesondere die Variante 7, für eine Resistenz gegenüber der antihormonellen Therapie verantwortlich sind. Auf der Ebene der CTCs konnte dies molekularbiologisch eindrucksvoll belegt werden, so dass Patienten, die die Variante 7 auf den CTCs exprimierten ein signifikant verkürztes PFS und OS aufwiesen. Die methodische Erweiterung der CTC-Analyse hat den CTCs in dieser Tumorentität den Einzug in den klinischen Alltag ermöglicht [22, 23]. Ähnliche Untersuchungen haben wir in der Gruppe der TNBC-Patientinnen durchgeführt. Abschließend wissen wir, dass eine Anti-AR-Therapie vermutlich hier nicht erfolgreich sein wird, da 75 % der Patientinnen, die AR-positive CTCs aufwiesen auch CTCs mit der Variante 7 beherbergten. Interessanterweise haben sich aber CTCs, die das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) überexprimierten, als hochsignifikanter, prädiktiver Marker für ein signifikant verkürztes PFS erwiesen [24].

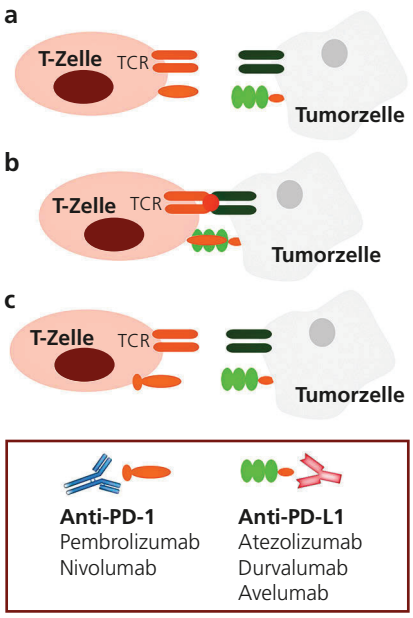

Abb. 2: Immuncheckpoint-Inhibitoren. Immuncheckpoints sind wichtige Kontrollpunkte des Immunsystems und befinden sich auf T-Zellen, die deren Immunantwort steuern. **a)** T-Zellen besitzen Rezeptoren (T-Zellrezeptor; TCR) und sogenannte Checkpoints (Programmed Cell Death Protein 1; PD-1), die an Liganden auf Tumorzellen (PD-L1) binden, da diese bei Tumoren im Tumorgeschehen hochreguliert sind. **b)** Durch Bindung von PD-L1 an PD-1-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen wird die Aktivität der T-Zellen gemindert. **c)** Durch die Gabe von Checkpointinhibitoren gegen PD-1 (z. B. Pembrolizumab, Nivolumab) oder PD-L1 (z. B. Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab) wird die Bindung von Rezeptor und Ligand gehemmt und es kommt zu einer erhöhten Aktivität des Immunsystems gegen die Tumorzellen.

In der sich im Vormarsch befindlichen immunonkologischen Therapie sind die sogenannten Immuncheckpoints ein zentraler Ansatzpunkt, der sich auf T-Zellen befindet (Programmed cell death protein 1; PD-1) und die Immunreaktion steuert (▶ Abb. 2). Tumorzellen nutzen den Mechanismus und interagieren mit diesen Zellen über PD-L1 (Programmed cell death protein ligand-1), um sie letztendlich zu inaktivieren. Zu den bekanntesten Inhibitoren zählen Ipilimumab beim Melanom, Nivolumab beim fortgeschrittenen Lungenkarzinom und Atezolizumab beim metastasierten TNBC [25]. PD-L1 wird vermehrt auf CTCs bestimmt, um Gewebebestimmungen zu ersetzen. Beim NSCLC wurde eindrucksvoll belegt, dass die Präsenz und Persistenz PD-L1-positiver CTCs unter Therapie mit Nivolumab mit einem Progress der Erkrankung assoziiert war, wobei diese persistierenden Zellen vermutlich eine Art Therapie-Escape-Mechanismus darstellen [26, 27]. Beim Mammakarzinom gibt es bisher zwei Studien, die sich mit dieser Thematik beschäftigt haben. In einer kleinen Studie mit 16 HR/HER2-negativen Patientinnen wiesen 11 von 16 Patientinnen PD-L1-exprimierende CTCs auf [28]. Eine umfangreichere Studie unter Einschluss von 100 frühen und 98 metastasierten Brustkrebspatientinnen zeigte, dass gerade in der letzteren Gruppe die Präsenz PD-L1-exprimierender CTCs ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein erhöhtes Rezidivrisiko und ein kürzeres OS waren [29].

Aber auch für Patientinnen mit HER2-negativen CTCs werden aktuell interessante Studienansätze evaluiert. Im Programm der DETECT-Studiengruppe erhalten HR-positive Patientinnen mit Indikation einer antihormonellen Therapie in der DETECT-IVa-Studie Everolimus (mTOR-Inhibitor) oder den CDK4/6-Inhibitor Ribociclib, wobei Patientinnen mit Indikation einer Chemotherapie oder HR-negativem Mammakarzinom mit Eribulin behandelt werden (DETECT IVb). Dabei werden in translationalen Programmen auch PI3K-Mutationen sowie Receptor Activator of

NF-κB (RANK und RANK-Ligand)-Expressionen auf CTCs bei Patientinnen mit Knochenmetastasen unter Gabe von Denosumab, einem Anti-RANKL-Medikament, evaluiert [2].

CTCs: Sind ihre Inhalte nicht viel informativer? Die Bedeutung der Tumor-DNA und anderer löslicher Faktoren

Nachdem viele klinische Studien zu CTCs eher negativ ausfielen und die Methoden zur Selektion und Charakterisierung als oft aufwendig, wenig standardisiert und teuer beschrieben wurden, steht die Analyse ihrer zellulären Inhalte im Fokus. Zusammengefasst unter dem Begriff Liquid Biopsy (Flüssigbiopsie) versteht man hier neben der Betrachtung der CTCs auch die Analyse ihrer Komponenten wie Nukleinsäuren, Proteine – frei oder in Vesikeln verpackt. Stark im Vormarsch und in einigen Bereichen schon in der Klinik angekommen, ist die Evaluierung der zellfreien DNA (cell-free DNA [cfDNA]), zu der auch die zirkulierende Tumor-DNA (circulating tumor DNA [ctDNA]) zählt. Tumorspezifische Aberrationen, wie Mutationen in Tumorsuppressor-Genen 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. Auch wenn vielfach argumentiert wird, dass die Isolation und Charakterisierung methodisch einfacher und kostengünstiger ist, sollte man diese Analysen in keiner Weise unterschätzen. Eine präzise, nicht immer kostengünstige Analytik ist notwendig, um keine falsch-positiven Ergebnisse zu generieren. DNA hat im Blut eine Halbwertszeit von 1–2 Stunden, ist also schnell fragmentiert, so dass auch die Präanalytik (z. B. Wahl der Abnahmeröhrchen) eine entscheidende Rolle spielt. Weiterhin findet man in der onkologischen Situation eine Mischung aus cfDNA und ctDNA, wobei es zunächst nicht möglich ist, den Anteil an ctDNA zu bestimmen, der je nach Tumorentität stark variiert [30].

Jedoch sind heute sensible Methoden etabliert worden, die in einigen Bereichen schon eine Zulassung erhalten haben. Vielfach für die Tumorprogression und Resistenzbildung gegen endokrine und gegen ERBB2-gerichtete Therapien beim Mammakarzinom untersucht sind Mutationen im Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweges (PI3K). Zugelassen für diesen Marker sind die Tests Therascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit (QIAGEN) und der FoundationOne Liquid CDx-Test (Next Generation Sequencing, Foundation Medicine). Auch von der FDA seit 2018 zugelassen ist der Guardant360® ctDNA-Test (Guardant Health) zur Therapieentscheidung und -überwachung fortgeschrittener solider Tumoren. Dabei werden mehr als 70 Gene auf Punktmutationen, zum Teil Indels (Insertionen/Deletionen), Amplifikationen und Fusionen untersucht. Zu ihnen gehört auch die Analyse von Mutationen im Östrogenrezeptor (ESR1), die in 20 % der Metastasenbiopsien von Mammakarzinom-Patientinnen und in der ctDNA detektiert wurden, wobei der Nachweis mit der Resistenz gegenüber der endokrinen Therapie assoziiert war. Ein weiterer Test mit FDA-Zulassung im Jahre 2016 ist der Cobas®-Test (Roche) zum Nachweis von Mutationen im EGFR-Gen zur Vorhersage des Ansprechens auf eine Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie beim fortgeschrittenen NSCLC. Klinisch haben gerade eine Vielzahl an Mammakarzinomstudien die Wertigkeit der ctDNA-Analyse als prädiktiven und Monitoring-Marker bestätigt. Dazu zählen die BELLE-, BOLERO-, MONALEESA- und PALOMA-Studien, PADA-1 sowie einige weitere, die durch Nachweis der entsprechenden PIK3CA-, ESR1- oder EGFR-Mutationen zeigen konnten, dass Patientinnen von den jeweiligen Kombinationstherapien profitierten [31, 32]. Klinisch sicherlich Vorreiter im Bereich Mammakarzinom ist die plasmaMATCH-Studie, die die ctDNA von über 1.000 Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom im Hinblick auf Mutationen (ESR1, HER2, AKT1) untersuchte, für die auch zielgerichtete Medikamente zur Verfügung stehen (Fulvestrant, Neratinib und Capivasertib). Die ersten Studienergebnisse deuten darauf hin, dass diese Vorgehensweise eine zielgerichtete Behandlung ermöglichen kann [33].

Jenseits der ctDNA: Welche Analyten müssen wir zusätzlich berücksichtigen und welche Rolle spielen lösliche Marker des Immunsystems?

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 Potpourri an Markern enthalten (Proteine, Lipide, DNA, RNA). 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 [1].

Die Gabe von Immuncheckpoint-Inhibitoren verstärkt auch die Suche nach prädiktiven Biomarkern, jenseits der CTCs. Die Liganden von PD-1, PD-L1 und PD-L2 spielen eine

wichtige Rolle in der Tumorumgebung und werden als prognostische Marker für den Verlauf einer Erkrankung diskutiert. Unsere Arbeitsgruppe hat in Kooperation mit PD Dr. Vera Rebmann aus dem hiesigen Institut für Transfusionsmedizin Studien zu löslichem (soluble; s) sPD-L1 und sPD-L2 beim Ovarialkarzinom durchgeführt. Verglichen mit gesunden Spendern waren sPD-L1-Spiegel zu Beginn der Erkrankung signifikant erhöht und sPD-L2 erniedrigt. Insbesondere sPD-L2-Spiegel waren mit der Resistenz gegenüber einer Platin-basierten Therapie und der Präsenz von CTCs mit Resistenzcharakter assoziiert. Hohe sPD-L1-Spiegel wiesen auf ein erheblich verkürztes 5-Jahres-PFS und -OS hin, wobei sPD-L1-Spiegel $> 6{,}4$ pg/ml gerade Platin-sensitive Patientinnen mit reduziertem PFS und OS identifizieren konnten. Stratifizierte man Platin-resistente Patientinnen entsprechend dieses Cut-off-Wertes, so gab es keine Unterschiede im Verlauf der Erkrankung [34]. Bei unseren Untersuchungen zum TNBC deuten sich ähnlich spannende Ergebnisse an, die jedoch noch nicht veröffentlicht sind.

Zusammenfassung

Die Möglichkeiten einer Liquid Biopsy sind vielseitig und die klinische Fragestellung wird vermutlich in Zukunft entscheiden, welcher Analyt in welcher Tumorentität und der gegebenen klinischen Situation sinnvoll ist. Die Internationalen Liquid Biopsy Gesellschaften arbeiten mit Hochdruck vereint an dieser Thematik, beginnend mit standardisierten Methoden. In ihrem Fazit sind sich die Gesellschaften aber einig, dass erst eine Multi-Marker-Analyse (Immunmarker-beinhaltend) das Gesamtbild der Erkrankung wiederspiegeln kann. Weiterhin müssen für die Bewertung der Daten Algorithmen erarbeitet werden, wobei der künstlichen Intelligenz eine große Rolle zukommen wird. Einen kleinen Vorgeschmack, welches Ergebnis eine solche Analyse in der metastasierten Situation des Mammakarzinoms im Therapieverlauf erzielen kann, ist in unserer aktuellen Publikation in der Fachzeitschrift Genome Medicine umfangreich dargestellt. Die gleichzeitige Analyse der Messenger-RNA (mRNA) und der genomischen DNA (gDNA) der CTCs sowie der ctDNA oder in Vesikeln verpackter mRNA hat das Fazit, dass alle Analyten voneinander abhängig sind, jedoch die gDNA der CTCs in dieser kleinen Pilotgruppe von 26 Patientinnen die größte Information für die Patientin enthielt [35]. Diese Ergebnisse weisen vorsichtig darauf hin, dass wir auf die CTCs zukünftig in der Gesamtanalyse nicht verzichten können. Sicherlich ist diese Vorgehensweise noch Zukunftsmusik, da der Aufwand groß und die Finanzierung aktuell noch in keinem vertretbaren Rahmen steht, doch die Entwicklung in diesem Feld ist enorm und lässt spannende Ergebnisse erhoffen.

Schlüsselwörter: Zirkulierende Tumorzellen – zirkulierende DNA – Liquid Biopsy – Immuncheckpoints

Literatur:

1. Cortés-Hernández LE et al. Circulating tumor cell as the functional aspect of liquid biopsy to understand the metastatic cascade in solid cancer. Mol Aspects Med 2020; 72: 100816
2. Vasseur A et al. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. Mol Oncol 2021; 15: 1647–66
3. Aktas B 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
4. Kuhlmann JD et al. ERCC1-positive circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients as a predictive biomarker for platinum resistance. Clin Chem 2014; 60(10): 1282–89
5. Kasimir-Bauer S 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(1): 20
6. Karagiannis GS et al. Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism. Sci Transl Med 2017; 9(397): eaan0026
7. Grosser S et al. Cell and Nucleus Shape as an Indicator of Tissue Fluidity in Carcinoma. Phys Rev 2021; X 11, 011033
8. Kolb AD et al. Osteoblasts are „educated" by crosstalk with metastatic breast cancer cells in the bone tumor microenvironment. Breast Cancer Res 2019; 21(1): 31
9. Gregory AD, McGarry Houghton A. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. Cancer Res 2011; 71(7): 2411–16
10. Szczerba BM et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. Nature 2019; 566: 553–57
11. Kargl J et al. Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer. Nat Commun 2017; 8: 14381
12. Liu X et al. Homophilic CD44 Interactions Mediate Tumor Cell Aggregation and Polyclonal Metastasis in Patient-Derived Breast Cancer Models. Cancer Discov 2019; 9(1): 96–113
13. Antunes-Ferreira M et al. Circulating platelets as liquid biopsy sources for cancer detection. Mol Oncol 2021; 15(6): 1727–43
14. Ishay-Ronen D et al. Gain Fat-Lose Metastasis: Converting Invasive Breast Cancer Cells into Adipocytes Inhibits Cancer Metastasis. Cancer Cell 2019; 35(1): 17-32.e6
15. Georgoulias V 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(7): 1744–50
16. Rack B et al. Trastuzumab clears-HER2/neu-positive isolated tumor cells from bone marrow in primary breast cancer patients. Arch Gynecol Obstet 2012; 285: 485–92
17. Ignatiadis M 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(8): 1777–83

Summary

Circulating tumor cells: multicultural, manipulative and often accompanied – Are there new perspectives?
S. Kasimir-Bauer

The use of biological fluids such as blood as a non-invasive cell-and nucleic acid biomarker pool 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 International Societies of Liquid Biopsy recommend multi-marker approaches, including markers that represent the immune system, to get the complete picture of the disease. Besides standardization of the methods, we have to define algorithms including arificial intelligence for interpretation of the data. One example how it could look like is one of our recently published articles in Genome Medicine where we demonstrated that each of the analyzed markers (mRNA of CTCs, gDNA of CTCs, ctDNA and mRNA containing vesicles) in the follow-up of metastatic breast cancer was dependent on each other with most of the important information being present in the gDNA of CTCs in this small pilot study including 26 patients [35]. Consequently, we cannot replace CTCs by other markers. Although the analysis of blood-based biomarkers for routine clinical use is too comprehensive and too cost effective, at the moment, this field is rapidly moving forward and will deliver exciting results within the next years.

Keywords: circulating tumor cells – circulating DNA – liquid biopsy – immune checkpoints

18. Fehrenbacher L et al. NSABP B-47/NRG Oncology Phase III Randomized Trial Comparing Adjuvant Chemotherapy With or Without Trastuzumab in High-Risk Invasive Breast Cancer Negative for HER2 by FISH and With IHC 1+ or 2+. J Clin Oncol 2020; 38: 444–53
19. Jacot W et al. Actionability of HER2-amplified circulating tumor cells in HER2-negative metastatic breast cancer: the CirCe T-DM1 trial. Breast Cancer Res 2019; 21(1): 121
20. Bittner AK et al. Molecular characterization of circulating tumour cells identifies predictive markers for outcome in primary, triple-negative breast cancer patients. J Cell Mol Med 2020; 24(15): 8405–16
21. Agelaki Set al. Phenotypic characterization of circulating tumor cells in triple negative breast cancer patients. Oncotarget 2017; 8: 5309–22
22. Antonarakis ES et al. ARV7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. N Engl J Med 2014; 371: 1028–38
23. Scher HI et al. Association of AR-V7 on circulating tumor cells as a treatment-specific biomarker with outcomes and survival in castration-resistant prostate cancer. JAMA Oncol 2016; 2: 1441–49
24. Kasimir-Bauer S et al. Circulating Tumor Cells Expressing the Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) Indicate Worse Outcome in Primary, Non-Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. Front Oncol 2020; 10: 1658
25. Larroquette M et al. Combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in advanced solid tumours: A review. Eur J Cancer 2021; 158: 47–62
26. Nicolazzo C et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. Sci Rep 2016; 6: 31726
27. Sinoquet L et al. Programmed Cell Death Ligand 1-Expressing Circulating Tumor Cells: A New Prognostic Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Chem 2021; hvab131
28. Mazel M et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. Mol Oncol 2015; 9: 1773–82
29. Papadaki MA et al. Clinical Relevance of Immune Checkpoints on Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. Cancers (Basel) 2020; 12
30. Keller L et al. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. Br J Cancer 2021; 124(2): 345–58
31. Fiste O et al. Circulating tumor DNA-based predictive biomarkers in breast cancer clinical trials: a narrative review. Ann Transl Med 2020; 8(23): 1603
32. Cheng ML et al. Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions. CA Cancer J Clin 2021; 71(2): 176–90
33. Turner NC et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. Lancet Oncol 2020; 21(10): 1296–308
34. Buderath P et al. Soluble Programmed Death Receptor Ligands sPD-L1 and sPD-L2 as Liquid Biopsy Markers for Prognosis and Platinum Response in Epithelial Ovarian Cancer. Front Oncol 2019; 9: 1015
35. Keup C et al. Integrative statistical analyses of multiple liquid biopsy analytes in metastatic breast cancer. Genome Med 2021; 13(1): 85

Interessenkonflikt:
Die Autorin erklärt finanzielle Verbindungen zu QUIAGEN in Form von Beratungstätigkeiten und eine enge wissenschaftliche Kooperation. Ansonsten bestehen keine Interessenkonflikte.

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. rer. nat. Sabine Kasimir-Bauer
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstraße 55
45122 Essen
Tel.: 0201 723 2443
Sabine.Kasimir-bauer@uk-essen.de

Prof. Dr. rer. nat. Sabine Kasimir-Bauer