

Liquid Biopsy – eine interdisziplinäre Aufgabe

Prof. Dr. Barbara Dockhorn-Dworniczak

Hochempfindliche Analyseverfahren erlauben inzwischen die Untersuchung einzelner Tumorzellen und zellfreier DNA aus Blutproben. Diese sogenannte *liquid biopsy* gewinnt zunehmend an Bedeutung, denn sie ist nicht-invasiv und erlaubt die Detektion tumor-typischer Genmutationen mit hoher analytischer Sensitivität und Spezifität.

Dies dient vor allem der Therapieüberwachung, erlaubt Rückschlüsse auf die Tumorprogression und kann das Auftreten eines Rezidivs anzeigen, bevor dieses klinisch erkennbar wird. Die frühzeitige Detektion von Resistenzmutationen gibt zudem Hinweise für eine rechtzeitige Therapieumstellung.

Ob Untersuchungen von zellfreier DNA zum Nachweis okkulterer Tumorerkrankungen im Rahmen einer Früherkennung herangezogen werden können, ist dagegen noch umstritten. Technisch ist es denkbar, setzt aber die Etablierung valider und stabiler Biomarker voraus. Hier steht noch viel Arbeit an, die nicht von uns Pathologen allein geleistet werden kann.

Die parallele Untersuchung von Geweben aus Primärtumoren und Metastasen sowie von Blutproben im Rahmen der *liquid biopsy* erfordert noch stärkere Interdisziplinarität in der Behandlung onkologischer Patienten, als dies bisher der Fall ist. Die Pathologie hat im Konzert der beteiligten Ärzte dann nicht mehr unbedingt das letzte Wort – wohl aber weiterhin das erste: Nach der momentanen Datenlage sind Ergebnisse aus zirkulierenden Tumorzellen und zellfreier DNA ohne die Ausgangsbefunde im primären Tumor und dessen Metastasen nicht bewertbar.



Zirkulierende Tumorzellen

Auf der Suche nach den schwarzen Schafen

Lange Zeit wurden die im Blut zirkulierenden Tumorzellen als Ausgangspunkt der Metastasierung diagnostisch und therapeutisch vernachlässigt. Verbesserte Verfahren zur molekularen Charakterisierung sollen helfen, die Pathomechanismen der hämatogenen Streuung aufzuklären und gezielte Therapien zu entwickeln.

Der australische Arzt Thomas Ashworth staunte nicht schlecht, als er 1869 das Blut aus der Beinvene eines Krebspatienten unter dem Mikroskop betrachtete. Darin fand er Zellen mit großen Kernen, die mit denen im Primärtumor verwandt zu sein schienen. Er notierte damals: „Eines ist sicher, wenn diese Zellen aus einer existierenden Krebsstruktur stammen, dann müssen sie einen Großteil des Kreislaufs passiert haben, ehe sie in der *Vena saphena* des gesunden Beins ankamen.“

Ashworth ahnte damals bereits, dass er etwas Wegweisendes entdeckt haben könnte – wohl gemerkt zu einer Zeit, als viele Ärzte Krebs noch für einen eigenständigen Parasiten hielten. Er schrieb, die von ihm entdeckten Zellen könnten „Licht auf die Entstehung multipler Tumoren in ein und derselben Person werfen“.

Mit seiner Vermutung hatte er Recht. Wir wissen heute, dass zirkulierende Tumorzellen (CTC = *circulating tumour cells*) in Blut und Lymphe tatsächlich der Ausgangspunkt jener Metastasen sind, an denen 90 Prozent aller Krebspatienten sterben. Und wir müssen umso erstaunter fest-

stellen, dass die Medizin trotz dringenden Bedarfs auch 150 Jahre nach Ashworths Entdeckung noch kaum in der Lage ist, CTC sicher zu quantifizieren, molekularbiologisch zu charakterisieren und gezielt zu bekämpfen.

Ein wichtiger Grund für die Diskrepanz zwischen medizinischem Wollen und Können liegt in der verschwindend geringen Zahl von Tumorzellen: Eine einzige CTC pro Milliliter wird bereits als prognostisch ungünstiges Zeichen gewertet, und die zirkuliert im Blut gemeinsam mit Millionen weißer und Milliarden roter Blutzellen.

Zwei Wege zum selben Ziel

Als Richtwert bei einem metastasierenden Karzinom schätzt man das Verhältnis von CTC zu allen anderen kernhaltigen Zellen im peripheren Blut auf 1:10⁶ bis 1:10⁷. Wie aber soll man ein „schwarzes Schaf“ in einer Herde von bis zu zehn Millionen finden? Man kann sich dem Problem auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen nähern: Der eine ist die Anreicherung der gesuchten Tumorzellen (siehe Tabelle), der andere die Entfernung der unerwünsch-



Bild © image/CHROMORANGE

ten Blutzellen, etwa durch Ausfällung von Leuko- und Erythrozyten (*Rossette-Sep-Test*). Beide Wege führen zum selben Ziel, nämlich den CTC-Anteil so weit zu erhöhen, dass er nicht im Grundrauschen der Nachweisverfahren wie zum Beispiel der Durchflusszytometrie untergeht. Allerdings schwanken die Ausbeuten der verschiedenen Techniken zwischen etwa 10 und 90 Prozent, sodass die Interpretation quantitativer Resultate mit Vorsicht und Sachkenntnis erfolgen muss.

Gute Anregungen für eine kritische Bewertung auch seit langem etablierter Tests finden sich in einem aktuellen Review von Millner et al. [1]. Bereits 2004 erteilte die

Food and Drug Administration (FDA) zum ersten Mal einem CTC-Test (*CellSearch*) zur Zellzählung und Verlaufsvorhersage bei metastasierendem Brustkrebs die Zulassung. 2007/2008 wurde diese auch auf Darm- und Prostatakrebs ausgeweitet.

Ob die medizinische Aussage den Selbstzahler-Preis von derzeit 460 € rechtfertigt, müssen Arzt und Patient(in) allerdings sorgfältig abwägen: Wenn in einer 7,5-mL-Probe fünf oder mehr Tumorzellen gefunden werden, verringert sich das progressionsfreie Intervall beim metastasierenden Mamma-CA im Mittel von 7,0 auf 2,7 Monate und die Gesamtüberlebenszeit von 18 auf 10 Monate [1].

Kostenerstattung

Die gesetzliche Krankenversicherung übernimmt die Kosten für die CTC-Analyse nicht, aber im Rahmen von Studien ist eine Erstattung möglich. Allein zum Mammakarzinom laufen am *Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg* (NCT) derzeit 13 klinische Evaluationen von zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen aus Blut und Knochenmark (CTC, DTC), um den Nutzen für die Diagnostik und Therapieoptimierung zu prüfen.

Das Anreicherungsverfahren von *CellSearch* und anderen etablierten Kits basiert auf der immunologischen Erkennung des Oberflächenmarkers EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), kombiniert mit einer Antikörpermixtur gegen intrazelluläre Cytokeratine (CK 8, 18 und 19). Für Karzinomzellen ist dieser Cocktail gegen epitheliale Marker prinzipiell geeignet, aber die Sache hat einen Haken: Um den sicheren Hafen des Muttergewebes verlassen und im zirkulierenden Blut überleben zu können, müssen CTC nämlich neue molekulare Eigenschaften erwerben.

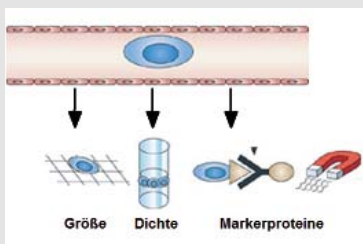
Bei dieser *epithelial-mesenchymalen Transition* (EMT) kommt es zu bedeutenden Änderungen der Genexpression und Zellmorphologie: Die von den Anreicherungsverfahren erkannten Adhäsionsmoleküle und Keratine nehmen ab und andere Marker, etwa Vimentin und Matrixmetalloproteasen steigen an. Durch die Umwandlung des Phänotypen können folglich potenziell interessante CTC übersehen werden.

Abhilfe schaffen Methoden, die zusätzlich EMT-typische Marker erfassen oder physikalische Tumorzelleigenschaften wie Größe, Dichte, Plastizität und elektrische Polarisierbarkeit nutzen. Große Hoffnungen

Kommerzielle Verfahren zur Anreicherung zirkulierender Tumorzellen

Tumorzellen aus EDTA-Blut zu gewinnen und zu analysieren, ist eine anspruchsvolle Aufgabe, die bislang noch nicht zum Standardangebot der Labordiagnostik gehört. Mit wachsendem Wissen über die Metastasenentstehung könnte sich dies allerdings in den nächsten Jahren ändern.

Welche Techniken sich auf Dauer durchsetzen, ist noch nicht absehbar; jedes Trennprinzip hat Vor- und Nachteile. Die Tabelle führt einige im Markt erhältliche Produkte auf, die nach häufig eingesetzten Trennprinzipien arbeiten. Eine ausführliche Übersicht ist in Vorbereitung.



Häufig eingesetzte Trennprinzipien

(nach Pantel, Brakenhoff, Brandt, *Nature Reviews Cancer* 2008; 8:329-340).

Name	Hersteller	Prinzip	Internet
AdnaTest	Adnagen	magnetgekoppelte Antikörper	adnagen.com
CellSearch	Veridex	magnetgekoppelte Antikörper	cellsearchctc.com
ISET	RareCells	Größenseparation mit Filter	rarecells.com
IsoFlux	Fluxion Biosciences	magnetgekoppelte Antikörper	fluxionbio.com
MACS	Miltenyi Biotec	magnetgekoppelte Antikörper	miltenyibiotec.com
OncoQuick	Greiner Bio-One	Dichtegradient mit Filter	greinerbioone.com

setzt man auf Mikrofluidik-Chips, die im Durchflussverfahren (*continuous flow*) betrieben werden und verschiedene an- und abreichernde Trennverfahren kombinieren. Mit ihnen lassen sich hohe Ausbeuten intakter Tumorzellen erzielen, die dann einer weiteren biochemischen und pharmakologischen Charakterisierung zugänglich sind.

Spannende Fragestellungen

Auch wenn die CTC-Isolierung noch eine große Herausforderung darstellt, winken als Lohn für die Mühe wesentlich spannendere Fragestellungen als die oben erwähnten, rein statistischen Aussagen zum meist deprimierenden *Outcome* metastasierender Karzinome. Entscheidend ist ja letztlich, ob es über die molekulare Charakterisierung gelingt, den verhängnisvollen Prozess der hämatogenen Streuung zu verhindern.

Lange – womöglich zu lange – konzentrierten sich die meisten Forschungsanstrengungen auf die Bekämpfung von Primärtumoren, doch angesichts von über

200.000 Menschen, die allein in Deutschland jährlich an den Folgen der Metastasierung und keineswegs an ihrer eigentlichen Krebsgeschwulst sterben, muss man sich fragen, ob der Kampf an den richtigen Fronten geführt wurde. Die Prozesse der Krebsentstehung sind zwar inzwischen recht gut verstanden, aber bei der Biochemie der Metastasierung gibt es noch viele Fragezeichen. Dank der Fortschritte bei der CTC-Isolierung und -Charakterisierung scheinen sich die Wissenslücken aber allmählich zu schließen.

Offenbar fördert Sauerstoffmangel im Primärtumor die Auswanderungsbereitschaft einzelner Zellen. Schon 2004 konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) ein Auslöser der verminderten Zelladhäsion ist.

Zudem macht die oben beschriebene *endothelial-mesenchymale Transition* die „Auswanderer“ aggressiver und versetzt sie in die Lage, die extrazelluläre Matrix ihrer unmittelbaren Umgebung aufzulösen und

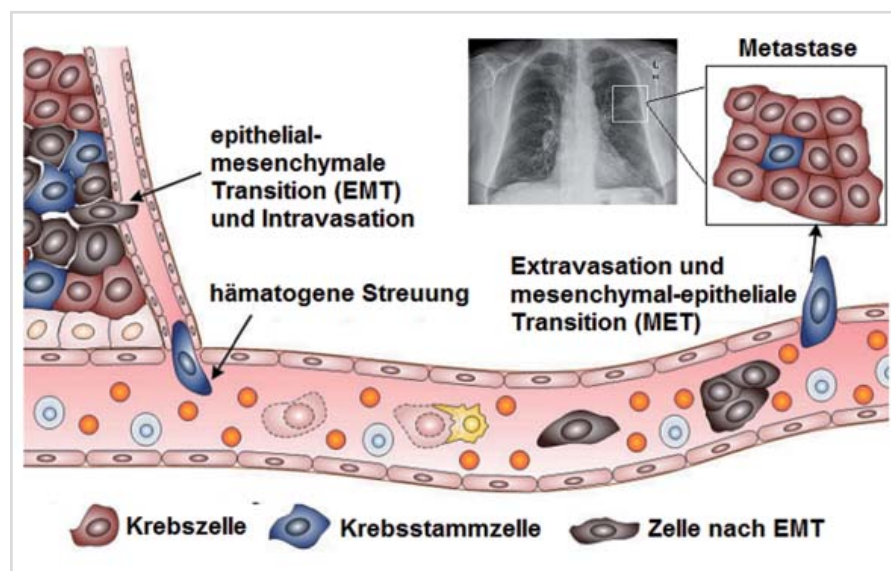
die endotheliale Barriere der angrenzenden Tumorgefäße zu durchbrechen. Die in der Blutbahn zirkulierenden Tumorzellen sind allerdings vielen Gefahren, darunter auch den Angriffen des Immunsystems, ausgesetzt, sodass 99,9 Prozent innerhalb von 24 Stunden absterben (sog. *Anoikis*).

Von den überlebenden 0,1 Prozent hat nur etwa jede zehnte das Potenzial, die Gefäßwand in umgekehrter Richtung erneut zu durchdringen, sich in einen epithelialen Krebszelltyp zurückzuverwandeln und in fremder Umgebung anzusiedeln. Dass es trotz dieser verschwindend geringen Erfolgsrate zu massiver Metastasierung kommen kann, liegt an der unglaublichen Zahl von einer Million Tumorzellen pro Tag, die ein Gramm Krebsgewebe ausschütten kann.

Eine schlechte Nachricht?

Offen bleibt die Frage, welche besonderen Fähigkeiten eine Tumorzelle besitzen muss, um zu den erfolgreichen 0,01 Prozent zu gehören. Seit etwa drei Jahren mehren sich die Anzeichen, dass zu den mesenchymalen Merkmalen auch noch Stammzeleigenschaften hinzukommen müssen; diese können entweder von vornherein vorhanden sein (sog. Tumorstammzellen) oder beim EMT-Prozess erworben werden.

Für die Entwickler von CTC-Tests ist dies eine eher schlechte Nachricht, denn die ohnehin schon extrem geringe Zahl „schwarzer Schafe“ in der Herde verringert sich dadurch womöglich nochmals um einige Zehnerpotenzen. 🌸



Vereinfachte Darstellung der hämatogenen Metastasierung, adaptiert nach [2]. Vor dem Verlassen des Tumorzellverbands ändern einige Krebszellen ihren Phänotypen von „epithelial“ in „mesenchymal“ (EMT). Nach Überwindung der Epithelbarriere (Invasionsfähigkeit) gelangen sie über die tumoreigene Gefäßversorgung in den Blutkreislauf. Ein Großteil der zirkulierenden Tumorzellen stirbt ab und wird phagozytiert. Einige – und zwar möglicherweise solche mit Stammzeleigenschaften – überleben jedoch, verlassen die Blutbahn und bilden in ganz bestimmten Organen Metastasen.

[1] Millner L et al, Circulating Tumor Cells: A Review of Present Methods and the Need to Identify Heterogeneous Phenotypes. *Ann Clin Lab Sci* 2013; 43:295-304

[2] Esmailsabzali H et al, Detection and isolation of circulating tumor cells: Principles and methods. *Biotechnol Adv* 2013; dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.016

Prof. Dr. Georg Hoffmann

Dr. Hans-Jürgen Kolde