

Pathologie 2015
DOI 10.1007/s00292-014-2069-x
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Redaktion
K.W. Schmid, Essen

E. Dahl^{1,2} · A. Jung³ · J. Fassunke⁴ · M. Hummel⁵ · R. Penzel⁶ · W. Dietmaier⁷ · S. Laßmann^{8,9,10,11}

¹ Institut für Pathologie, Uniklinik RWTH Aachen

² RWTH cBMB Biomaterialbank am Institut für Pathologie, Uniklinik RWTH Aachen

³ Pathologisches Institut, Ludwig-Maximilians Universität München

⁴ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln

⁵ Institut für Pathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin

⁶ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Heidelberg

⁷ Institut für Pathologie, Universität Regensburg

⁸ Institut für Klinische Pathologie, Dept. für Pathologie, Universitätsklinikum Freiburg

⁹ Comprehensive Cancer Center Freiburg (CCCCF), Universitätsklinikum Freiburg

¹⁰ BIOS Centre for Biological Signalling Studies, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

¹¹ Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK) und
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg

Chancen und Risiken der blutbasierten molekulopathologischen Analytik zirkulierender Tumorzellen (CTC) und zellfreier DNA (cfDNA) in der personalisierten Krebstherapie

Eine Stellungnahme des Arbeitskreises „Liquid Biopsy“ der AG Molekularpathologie in der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP)

In den letzten 3 Jahren hat die blutbasierte Analytik von Nukleinsäuren eine rasante Entwicklung genommen, sodass der Begriff „Flüssigbiopsie“ (engl. „liquid biopsy“) geschaffen wurde. Darunter versteht man eine überwiegend molekulare Analyse informationstragender Moleküle (DNA oder RNA) zumeist aus Blut (aber auch anderen Körperflüssigkeiten wie Urin) zur Früherkennung, Diagnose, Verlaufskontrolle oder eventuell Therapiestratifizierung von Erkrankungen wie z. B. Krebs. Bei den onkologischen Erkrankungen wird das Potenzial der „liquid biopsy“ insbesondere darin gesehen, die Tumormast nichtinvasiv zu „verfolgen“ und entstehende Resistenzen gegen spezifische Therapien bei Patienten mit metastasierten Tumoren frühzeitig zu erken-

nen. Aber auch der primäre Nachweis onkologischer Treibermutationen mittels Blutanalyse wird diskutiert. In der vorliegenden Stellungnahme soll aus Sicht von Molekularpathologen/innen und Molekularbiologen/innen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) eine Einschätzung erfolgen, ob die Liquid-biopsy-Diagnostik das Potenzial hat, die gewebebasierte molekulopathologische Diagnostik in Zukunft zu ergänzen.

Im Blut gibt es 2 Quellen von TumordNA, die sich einer molekularen Analyse erschließen. Dies sind die zirkulierenden Tumorzellen („circulating tumor cells“, CTC) und die zellfreie DNA („cell-free DNA“, cfDNA), die häufig, thematisch auf Tumoren eingegrenzt, auch zirkulierende TumordNA (ctDNA) genannt wird. Im

nachfolgenden Text wird ausschließlich die Abkürzung cfDNA verwendet. Nicht betrachtet werden in dieser Stellungnahme Nukleinsäuren aus extrazellulären Vesikeln wie den Exosomen, da hier die Datenlage generell noch sehr schwach ist.

Neue technologische Entwicklungen als Basis der Liquid-biopsy-Diagnostik

Bei Patienten mit Tumorerkrankungen finden sich aufgrund der veränderten Physiologie CTC und cfDNA im Blut. Jedoch sind die Mengen an CTC bzw. Nukleinsäuren, die sich aus Plasma oder Serum gewinnen lassen, sehr gering. Die Konzentration an cfDNA im Serum beträgt in den beschriebenen Studien zu-

meist zwischen 1 und 100 ng/ml, während im Allgemeinen aus 10 ml Blut zwischen keiner bis mehrere 100 „Tumor“zellen isoliert werden können. Daher wurden für die Isolation von CTC spezielle Verfahren entwickelt, die eine Anreicherung der „Tumor“zellen ermöglichen (z. B. Adnatest, CellSearch®, OnkoQuick®). Da mit diesen Verfahren an der Nachweisgrenze gearbeitet wird, sind die Abweichungen der positiven Detektionsraten sehr hoch (ca. 50%). Aufgrund der Varianzen ist es möglich, dass sich diese Verfahren auch zukünftig nicht durch Standardisierung vereinheitlichen lassen [3, 14, 21]. So hat bisher trotz der Vielzahl der unterschiedlichen methodischen Ansätze zur Anreicherung und Analyse von CTC lediglich das CellSearch®-Verfahren eine FDA-Zulassung (Food and Drug Administration) erhalten. Dieses System hat jedoch den Nachteil, dass es auf den stark regulierten zellulären Oberflächenmarker „EpCAM“ basiert ist und keine CTC anreichern kann, die eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen und damit EpCAM verloren haben, oder Tumorzellen, die schon primär EpCAM nicht exprimiert haben (z. B. Plattenepithelkarzinome).

Frei zirkulierende zellfreie DNA wird klassischerweise über Affinitätschromatographie gewonnen. Bedingt durch die nichtselektive Gewinnung bleibt jedoch unklar, aus welchen Zellen die DNA stammt (s. folgenden Abschnitt zu cfDNA). Zur Liquid-biopsy-Analyse sind aufgrund der geringen DNA-Ausgangsmengen aus beiden Quellen (CTC und cfDNA) hochverstärkende Verfahren notwendig, die auf dem Prinzip der Digitalisierung der Messsignale basieren [33]. Hierzu finden im Wesentlichen 2 Verfahren Anwendung:

- **BEAMing-PCR**, dies steht für *B*eads, *E*mulsion PCR, *A*mplification, *M*agnetic Beads und ist eine Kombination von digitaler Polymerasekettenreaktion (PCR) und Durchflusszytometrie [12, 13, 20].
- **NGS** (Next Generation Sequencing), also die hochparallele DNA-Sequenzierung [16, 20, 21].

Beiden Verfahren ist gemeinsam, dass die Amplifikation der Messsignale un-

abhängig voneinander und v. a. klonal oder digital erfolgt, d. h. ein Messsignal basiert auf einem einzigen DNA-Molekül. Dies kann zum einen mithilfe einer Emulsions-PCR (emPCR), wie beim BEAMing oder den NGS-Systemen Ion Torrent und 454 oder durch Clusterbildung, wie beim NGS-System MiSeq von Illumina, erreicht werden. Diese klonalen oder digitalen Amplifikate werden nun als Einzelereignisse gemessen. Dadurch gibt es – solange keine Kontaminationsprodukte im Prozess entstanden sind – nur noch das spezifische Messsignal, was zu einer nicht mehr verbesserbaren Sensitivität führt. Je nach Frequenz des Messsignals müssen entsprechend viele Einzelereignisse erzeugt werden. Dies erreicht die BEAMing-Methode durch ein sequenzspezifisches Fluoreszenzsignal, das dann mittels Fluorescent-activated-cell-sorter (FACS)-Analyse gemessen wird. Beim NGS erfolgt dies durch ein direktes Sequenzieren der PCR-Produkte und durch die Tiefe der Analyse, darunter versteht man die Anzahl der unabhängig gelesenen DNA Sequenzen, auch „coverage“ (Abdeckung) genannt. Deshalb sind beide Methoden potenziell technisch in der Lage, Mutationen mit Frequenzen von weit unter 1% nachzuweisen. Ob dies im Routinebetrieb erreichbar ist, bleibt offen.

Verwendung zellfreier zirkulierender Tumor-DNA (cfDNA) in diagnostischen Ansätzen

Zellfreie zirkulierende Tumor-DNA findet sich bei ca. 70% der metastasierten Tumorerkrankungen, jedoch gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Tumorentitäten in Abhängigkeit vom Tumorstadium [4]: Während in fortgeschrittenen kolorektalen und Ovarialkarzinomen in fast 100% der Fälle cfDNA nachweisbar ist, ist die Frequenz im Prostata- und Nierenzellkarzinom auch bei Metastasierung eher gering (um 40%). Stadium-IV-Tumoren zeigen über alle Entitäten betrachtet eine cfDNA-Detektionsrate von 82%, hingegen beträgt dieser Wert bei Stadium-I-Tumoren nur 47%. Für Gehirntumoren ist der cfDNA-Nachweis aufgrund der Blut-Hirn-Schran-

ke gänzlich ungeeignet, da weniger als 10 mutierte Fragmente pro 5 ml Blut gemessen werden konnten.

Noch wenig verstanden ist die Herkunft der cfDNA. Nach Ansicht der meisten Autoren stammt mutierte cfDNA aus nekrotischen bzw. apoptotischen Tumorzellen. Dies macht es per se schwierig zu argumentieren, warum genetische Information von sterbenden Tumorzellen geeignet sein soll, eine Aussage über mögliche resistente Tumorzellklone im Patienten zu treffen. Jedoch zeigte eine Studie beim kolorektalen Karzinom, dass auch therapieresistente Tumorzellen einen hohen „turnover“ zeigen und damit cfDNA abgeben könnten [9]. Bezüglich Freisetzung und Abbau von cfDNA im Blut sind daher weitergehende Analysen unbedingt notwendig.

Für die Messung der cfDNA ist meist nicht der reine Mengennachweis relevant, sondern die Bestimmung der Menge an veränderter cfDNA. Aufgrund der aktuellen klinischen Relevanz zielgerichteter Therapien haben sich viele Arbeitsgruppen mit dem Nachweis mutierter cfDNA bei Tumorpatienten beschäftigt: Eine der international führenden Arbeitsgruppen im Bereich der cfDNA-Analyse bei Tumorpatienten ist das Team um Nitzan Rosenfeld aus Cambridge. Die Autoren konnten zeigen, dass *PI3KCA*- und *TP53*-Mutationen bei Mammakarzinompatientinnen in der cfDNA messbar sind und sich die Menge der mutierten cfDNA im Verlauf unterschiedlicher Chemotherapien parallel zur Tumorlast verändert [7]. Im Vergleich zum Biomarker CA-15-3 und zirkulierenden Tumorzellen wies die mutierte cfDNA dabei einen besseren prädiktiven Wert auf.

Weiterhin analysierte die Arbeitsgruppe an cfDNA von 6 fortgeschrittenen Karzinompatienten (Mamma-, Lungen-, Ovarialkarzinome) unter Therapieverlauf Exom-Sequenzierungs- und digitale PCR-Daten [23]. Auch hier wurde die Tumorlast im Verlauf aus den Messdaten der „Treiber“ oder „Anker“-Mutation (d. h. der bekannten Mutation aus der initialen molekularpathologischen Analyse des Tumorgewebes) in der cfDNA errechnet. Da bei 2 Patienten auch Verlaufsbiopsien des Tumorgewebes vorlagen, konnte ein Vergleich der Mutationen in der Ver-

laufsbioptie vs. Verlaufs-cfDNA durchgeführt werden. Diese ergaben jedoch lediglich Übereinstimmungen von 60% (93/151 detektierte Mutationen beim Mammakarzinom) bzw. 19% (172/895 detektierte Mutationen beim Ovarialkarzinom). Eine Mikrodisektion der Tumorzellen aus den vorliegenden Geweben, wie sie in routine-diagnostischen molekularpathologischen Laboren Standard ist, erfolgte dabei allerdings nicht.

Ascierto et al. [1] zeigten in einer klinischen Phase-II-Studie (BREAK-2) bzgl. Dabrafenib im metastasierten Melanom einen prädiktiven Wert der mutierten cfDNA. Es wurden eine Übereinstimmung von *BRAF*-Mutationen der Tumorbiopsie mit denen der cfDNA von 84% (*BRAF*-V600E) und 97% (*BRAF*-V600K) sowie eine gute Übereinstimmung der Tumorlast (hier definiert als größter Tumordurchmesser) mit dem Anteil mutierter cfDNA angegeben. Zudem korrelierte die Rate der mutierten cfDNA mit dem Gesamt- und progressionsfreien Überleben, d. h. ein Versagen des Therapieansprechens korrelierte mit großen Tumoren und entsprechend mehr mutierter cfDNA.

Oxnard et al. [24] fokussierten sich auf die Untersuchung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) und der Messung mutierter cfDNA (*EGFR*, *KRAS*) durch digitale Droplet-PCR („beaming“). Da *EGFR*- und *KRAS*-Mutationen sich ausschließen, konnte der Vergleich von cfDNA-Mutationen in Patienten (deren Mutationsstatus aus dem Tumorgewebe bekannt war) dazu genutzt werden, vice versa jeweils einen „cut-off“ für falsch-positive Detektion festzusetzen. Das Verfahren wurde dann auf hohe Sensitivität und maximale Spezifität optimiert. Angewendet wurden die etablierten Tests für die Verlaufskontrolle einzelner NSCLC-Patienten unter Behandlung mit Erlotinib. Auch hier bezogen sich die Verlaufskontrollen in der cfDNA auf die im Tumorgewebe mittels molekularpathologischer Standards a priori bestimmten Mutationen. Es zeigte sich, dass die cfDNA-Mutationen mit der Tumorlast korrelierten und bei Therapieresistenz die *EGFR*-T790M-Mutation messbar wurde, wobei auch hier die bei Primärdiagnose im Tumorgewebe gemessenen Mutationsdaten bereits vorlagen.

In der bereits oben genannten Studie von Bettegowda et al. [4] detektierten die Autoren in cfDNA von 206 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom *KRAS*-Kodon-12- und -13-Mutationen mit einer Sensitivität von 87,2% bei einer Spezifität von 99,2%. Die Konkordanz zwischen den genannten *KRAS*-Mutationen im Tumorgewebe und Plasma betrug damit 95%. Allerdings zeigte sich auch, dass falsch-negative cfDNA-Ergebnisse (mutiertes *KRAS* im Tumor war nicht auffindbar im Plasma) signifikant mit einer muzinösen Histologie des kolorektalen Karzinoms und jüngerem Alter verknüpft waren. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Entstehung von Resistenzmutationen gegenüber *EGFR*-gerichteter Therapie mittels cfDNA-Analyse an den Genen *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR* und *PIK3CA* untersucht. Unter Therapie mit Panitumumab oder Cetuximab konnten in 23 von 24 analysierten Fällen mindestens eine Resistenzmutation nachgewiesen werden, wobei besonders Kodon 61 von *KRAS* und *NRAS* betroffen war. Einschränkung zu diesen an sich positiven Ergebnissen ist, dass für 9 der 24 Proben kein Primärtumor (aktueller Standard der prädiktiven Testung) verfügbar war und stattdessen Plasma-DNA vor Behandlung analysiert wurde.

Diese aufgeführten Studien haben somit gemeinsam, dass der zur Primärdiagnostik untersuchte Tumor die nachgeschaltete cfDNA-Analytik bestimmt hat und mit der cfDNA-Mutationsrate meist die globale Tumorlast gemessen wurde. In den meisten Studien bleibt die Bedeutung von cfDNA-Analysen in Verlaufsproben bzgl. Resistenzmutationen und möglicher Therapiestratifizierung ungeklärt, da z. B. bekannte Resistenzmutationen bereits im Tumorgewebe der Primärdiagnostik vorlagen [24] oder mögliche neue Resistenzmarker („discovery“) nachgewiesen wurden [23], die keinen unmittelbaren klinisch/therapeutischen Nutzen haben.

Probleme und Chancen der cfDNA-Analytik

Einige der neueren Studienergebnisse deuten darauf hin, dass die Analyse von cfDNA mittels innovativer, hochsensi-

ter Methoden (z. B. Multiplexingverfahren auf bekannte Mutationshotspots) ein brauchbarer Biomarker bei verschiedenen soliden Tumoren sein könnte. Gerade für die Suche nach frühen Anzeichen einer Tumorresistenz unter Therapie (im Sinne der gemessenen Tumorlast in cfDNA) könnte diese Analytik in einigen Jahren den bildgebenden Verfahren überlegen sein. Diese Anwendung der cfDNA-Analytik befindet sich derzeit aber noch im Bereich der Forschung und sollte intensiv in Studienansätzen validiert werden. Fragen nach Herkunft, Stabilität und Abbau der cfDNA bei unterschiedlichen klinisch-pathologischen Bedingungen müssen in Betracht gezogen werden, um eine robuste und für die weitere klinische Therapieentscheidung gesicherte Diagnostik zu ermöglichen. Weiterhin bleiben auch technische Probleme, da zumindest PCR-basierte Verfahren aufgrund ihrer inhärenten Fehlerrate Punktmutationen nur mit Sensitivität von einer in 100.000 Zellen nachweisen können [4]. Der Weg hin zu einer möglichen Routinediagnostik erscheint also noch weit.

Hingegen könnten die leichte Verfügbarkeit der Blutproben und die hohe technische Sensitivität der heutigen Amplifikationsverfahren die cfDNA-Analyse in naher Zukunft zu einem sehr geeigneten Verfahren machen, um die Tumorlast zu bestimmen. Dies jedoch nur, wenn vorab molekularpathologisch die Treiber(Anker)-Mutationen am resezierten, histologisch klassifizierten Tumorgewebe ermittelt wurden. Damit wird auch klar, dass die cfDNA (alleine) keinen Ersatz für die (initiale) Tumordiagnostik (Dignitätsbestimmung, Klassifikation) ist oder gar sein kann. Ein größeres Potenzial verspricht die cfDNA-Analyse jedoch für das Therapiemonitoring, sofern bisher ungeklärte Fragen, wie die nach der Bedeutung neu auftretender (Resistenz-)Mutationen in der cfDNA im Verlauf der Behandlung, geklärt werden können. Bedeutung und Umsetzung solcher „Zusatzinformationen“ für den klinischen Behandlungskontext müssen klaren Entscheidungspfaden folgen können.

Verwendung zirkulierender Tumorzellen (CTC) in diagnostischen Ansätzen

Zirkulierende Tumorzellen sind Krebszellen, die sich von Tumorgewebe gelöst haben und in extrem geringer Menge im Blut nachweisbar sind. Das Anreichern, Zählen und Untersuchen dieser Zellen wird zunehmend verwendet, um das Fortschreiten von Krebserkrankungen zu überwachen und ggf. personalisierte Therapien danach auszurichten. Entsprechend einer kürzlich erschienenen Publikation nutzten bereits mehr als 400 klinische Studien CTC als Biomarker [25]. Die meisten dieser Studien setzten die Zählung von CTC ein, um CTC als Surrogatmarker für eine Überlebensprognose von Patienten mit metastasierten Tumoren zu verwenden, z. B. beim Mamma- [15], Prostata- [8] und kolorektalen Karzinom [5].

In einer neueren Studie zur Kombination von Erlotinib und Pertuzumab beim NSCLC [29] wurde CTC-isolierte DNA auch auf *EGFR*-Mutationen hin untersucht. Im konkreten Fall konnte nur eine von 8 der über Gewebediagnostik gesicherten *EGFR*-Mutationen in den CTC wiedergefunden werden. Demgegenüber konnten in einer Studie mit 87 Lungenkarzinompatienten, von denen bekanntermaßen 5 eine *ALK*-Gen-Translokation aufwiesen, in allen Fällen die *ALK*-Positivität mittels FISH-Analytik bei CTC derselben Patienten nachgewiesen werden [17]. Eine weitere Studie verglich die *BRAF*- und *c-KIT*-Mutationen im Primärtumor, Metastasen und CTC von 11 Melanompatienten [31]. Während für 7 von 8 *BRAF*-Analysen der Genotyp übereinstimmte, war die Übereinstimmung bei *c-KIT* lediglich 50% (2/4) und viele Proben technisch nicht analysierbar. Auch beim kolorektalen Karzinom konnten bei einer sehr geringen Fallzahl (n=6) die tumorrelevanten Treiber(Anker-)mutationen auch mit NGS-Technologie nur bedingt in den CTC nachgewiesen werden [16]. Diese Studie wies jedoch 20 weitere, sogenannte „private Mutationen“ in den CTC nach, die zunächst nicht gewebebasiert gefunden werden konnten. Mittels besonders tiefer NGS-Sequenzierung und eines speziellen Auswerteverfahrens („deep single-

nucleotide variant algorithm“) konnte gezeigt werden, dass 17 von 20 (85%) dieser privaten CTC-Mutationen doch bereits als sehr seltene subklonale Varianten entweder im Primärtumor oder der Metastase vorlagen.

Probleme und Chancen der CTC-basierten Diagnostik

Da CTC sehr selten sind, müssen sie mit relativ aufwendigen Verfahren angereichert werden. Aber auch nach Anreicherung (z. B. mit CellSearch®) weisen nur 1,4% der Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom mehr als 500 CTC in 7,5 ml Blut auf [2]. Eine repräsentative molekulare Analyse von CTC scheint daher für die Mehrzahl der Patienten derzeit nicht möglich zu sein. Derzeit auch nicht möglich ist ein Vergleich der Verfahren zur Anreicherung und Isolierung von CTC in Hinblick auf Sensitivität und Spezifität: Zu vielfältig sind die Anzahl der Methoden und ihr Einsatz in ganz unterschiedlichen Studien. Diese Einschätzung spiegelt sich auch in einer Aktivität des National Institutes of Health (NIH) wider, eine CTC-Arbeitsgruppe (CTC Working Group, CWG) ins Leben zu rufen, die entsprechende Standards für die präanalytischen und analytischen Variablen definieren soll [27].

Weiterhin ist bis heute unklar, ob die CTC die Quellen der Tumorzellen sind, die Fernmetastasen („metastasis-initiating cells“, MICs) induzieren oder als sog. Tumorstammzellen („cancer stem cells“, CSC) bezeichnet werden. Die Arbeitsgruppe um Christoph Klein (Regensburg) hat sich intensiv mit diesem Thema auseinandergesetzt [19, 32]. Sie kommt zu dem Schluss, dass MIC und CSC zwar eine noch unklar definierte Untermergen der CTC darstellen, CTC aber im Vergleich zum Primärtumor und zur Metastase ein sehr heterogenes genetisches Profil aufweisen. Demgegenüber sind sich Primärtumor und Metastase molekular gesehen deutlich ähnlicher, weil sie das Ergebnis eines vergleichbaren Selektionsprozesses sind, der zur Bildung von Tumormasse führt.

Da primäre Tumoren oft bevorzugt in bestimmte Organe metastasieren, könnte eine organspezifische „Anreicherung“

von CTC stattfinden. Dies würde heißen, die Stelle der Blutentnahme für eine CTC-Analyse wäre kritisch. Punktationen an unterschiedlichen oder unkomfortablen Bereichen des Körpers wären dann kein minimal-invasives Verfahren mehr [28]. Tatsächlich zeigte sich in einer Studie zum kolorektalen Karzinom, dass im mesenterischen-venösen Blut deutlich mehr CTC zu finden sind als im meistens untersuchten zentral-venösen Blut [30]. Schließlich ist noch ungeklärt, warum CTC auch bei nichtonkologischen Patienten, z. B. bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, nachgewiesen werden können [26].

Zu den molekularen Expressionsprofilen aus CTC ist anzumerken, dass diese noch in den Kinderschuhen stecken und robuste Technologien zur Messung von Einzelzellen gerade erst entwickelt werden [6]. Ob die beobachtete Diskrepanz in den CTC-Expressionsprofilen auf technischen Problemen oder doch echten biologischen Unterschieden beruht, bleibt abzuwarten. Im letzteren Fall könnte dies natürlich die Stärke der zukünftigen molekularen CTC-Diagnostik ausmachen, wenn ein klarer Bezug zwischen der Veränderung des Mutations- und Expressionsspektrums unter Therapie und dem Ansprechen gezogen werden könnte; und dies nicht nur in einer kleinen Subgruppe von Patienten, die hohe CTC-Zahlen aufweisen.

Eine tiefgehende molekulare Analyse des CTC-Spektrums eines Patienten könnte z. B. auch genutzt werden, um Mikrometastasen in unterschiedlichen Organen aufgrund ihrer organotypischen Signatur „aufzuspüren“. Der Erfolg der CTC-basierten Diagnostik wird davon abhängen, wie sich diverse Einzelzell(„omics“)-Technologien weiterentwickeln und natürlich davon, ob die CTC das ihnen zugesprochene Informationspotenzial auch tatsächlich tragen.

Pharma- und Biotechfirmen als Dienstleister für Liquid-biopsy-Analysen

Der zukünftige „Wettstreit“ um die blutbasierte Diagnostik scheint bereits begonnen zu haben, da viele große kommerzielle Diagnostikentwickler sich bereits positionieren und mit innovativen

kleinen Biotechfirmen entweder Allianzen schmieden oder diese gleich aufkaufen. So hat die japanische SYSMEX kürzlich die deutsche Inostics übernommen, die mittels OncoBEAM-Technologie Liquid-biopsy-Analysen für Einzel-, Panel- und Custom-Gene anbietet. In den USA ist eine Reihe von Biotechfirmen entstanden, welche die „liquid biopsy“ als zentrales Geschäftsfeld entwickeln. So bietet z. B. die Firma MolecularMD Servicetests zum plasmabasierten Nachweis von *EGFR-T790M*-, *BRAF-V600E/K*- und *NRAS* Kodon-61-Mutationen an, wobei sowohl „droplet digital PCR“ als auch NGS eingesetzt werden. Die Firma Cynvenio Biosystems bietet mit einer Turnaround-Zeit von 5 bis 7 Arbeitstagen die parallele Analyse von 50 Onkogenen an CTC-DNA an.

Im Wettstreit der Analyte (CTC vs. cfDNA) scheinen die CTC wieder an Boden zu gewinnen, da es sehr innovative Verfahren gibt, CTC anzureichern bzw. alle relevanten Zellen einzuschließen. So hat GILUPI (Hamburg) einen „cell collector“ zur Anreicherung von CTC entwickelt, welcher aus einem funktionalisierten Nanodraht besteht, der mit EpCAM-Antikörpern beschichtet ist und 30 min in der Vene verbleibt, um CTC „abzufischen“. In diesem Zeitraum passieren ca. 1,5–3 L Blut den Draht und damit ist die Ausbeute an CTC wesentlich höher als bei bisherigen Verfahren. Innovativ ist auch ein neues Verfahren, alle 3 Mio. kernhaltigen Zellen einer 0,5 ml Blutprobe auf speziellen Objektträgern (Aqua™ Glass; Epic Sciences, La Jolla, Ca, USA) einzeln zu spotten und zu analysieren. Es liegen somit innovative kommerzielle Ansätze vor, dennoch muss deren diagnostischer und klinischer Wert sich erst noch erweisen.

Abschließende Bewertung zum derzeitigen Entwicklungsstand der Liquid-biopsy-Diagnostik

Zusammenfassend kann man zu folgender Einschätzung kommen: Vorangetrieben durch die Verfügbarkeit neuer hochsensitiver DNA-Analysetechniken wie der digitalen PCR und NGS wurde den onkologischen Forschern ein Vorstoß

in neue Grenzbereiche der Analytik ermöglicht. Die „liquid biopsy“, besonders in der Form der cfDNA-Analyse, lässt tatsächlich für die Zukunft ein großes, ergänzendes Potenzial zur gesicherten molekularpathologischen Diagnostik an Tumorgeweben erkennen. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen zur Konkordanz gewebe- und blutbasierter molekularer Diagnostik sind jetzt nötig. Es ist davon auszugehen, dass auf onkologischen Kongressen wie der American Association for Cancer Research (AACR) kontinuierlich weitere Beispiele für die prinzipielle Einsetzbarkeit der Liquid-biopsy-Diagnostik präsentiert werden. Tatsächlich wirken die oben genannten Ansätze auch außerhalb der Pathologie und Gewebediagnostik äußerst attraktiv, v. a. aufgrund der relativ einfachen Verfügbarkeit von Blutproben und der prinzipiellen Automatisierbarkeit der Methoden. Dadurch wird ein Markt geschaffen, der derzeit schon von Firmen bedient wird. Es ist daher anzunehmen, dass erhebliche Anstrengungen unternommen werden, diese Analytik breiter auszurollen – nicht zuletzt aus ökonomischen Gründen.

Allerdings ist dieser rasche Vorstoß kommerzieller Anbieter scheinbar bahnbrechender Analysemethoden aus Sicht der Molekularpathologen im Sinne der Wertschöpfung für die allgemeine Krankenversorgung eher kritisch zu bewerten: Die im Blut befindlichen Analyte – CTCs und cfDNA – können zwar schon derzeit in extremer Sensitivität analysiert werden, jedoch weiß man noch zu wenig über die Pathobiologie dieser Analyte. Die präzise Korrelation der CTC und/oder cfDNA zur pathologisch klassifizierten und gesicherten Erkrankung steht noch aus. Aber auch die technische Seite weist noch ungelöste Probleme auf: Zu einem sind derartig sensitive Verfahren sehr anfällig für Störungen (z. B. Kontaminationen), die nur durch höchste (weit über den derzeitigen Standard hinausgehende) Sicherheitsmaßnahmen beherrschbar sind. Weiterhin sind die derzeitigen Verfahren zur Analyse von CTC und cfDNA kaum standardisiert. Es gibt nur sehr wenige Studien, die CTC und cfDNA parallel analysiert haben. Wo geschehen (z. B. [4]), ist die Konkordanz zwischen

CTC und cfDNA sehr gering (19%). Die Halbwertszeit von cfDNA im Blut ist kurz (<1,5 h [11]), d. h. entsprechende Blutproben müssen innerhalb weniger Stunden verarbeitet oder gelagert werden. Dies macht das Qualitätsmanagement der Probenbearbeitung, wie es z. B. für Gewebe im Rahmen von QuIP (<http://www.dgp-berlin.de/index.php/menu-ringversuche/quip>) etabliert ist, sehr schwierig. Damit erscheint auch der Einsatz solcher Technologien für die Krankenversorgung derzeit nicht gerechtfertigt.

Zusammenfassung der wichtigsten Aussagen der Stellungnahme

- Die Liquid-biopsy-Diagnostik beschreibt die molekulare Analyse von Tumor-DNA aus Blut u. a. zur Diagnose, Verlaufskontrolle und Therapiestratifizierung von Erkrankungen wie Krebs.
- In der Form der cfDNA-Analyse könnte die „liquid biopsy“ ein mögliches ergänzendes Werkzeug zur gesicherten molekularpathologischen Diagnostik an Tumorgeweben darstellen.
- Einsatzgebiet könnte die nichtinvasive Verfolgung der Tumorlast mit eventuellem Monitoring von Treiber-/Resistenzmutationen unter Therapie sein.
- Problematisch ist die noch unverstandene enorme Variabilität der cfDNA-Konzentrationen zwischen unterschiedlichen Tumorentitäten und innerhalb eines Tumorstadiums.
- Der sinnvolle Einsatz der Liquid-biopsy-Diagnostik setzt die Kenntnis der Treibermutationen aus der molekularpathologischen Gewebediagnostik voraus.
- Offene Fragen nach Herkunft, Stabilität und Abbau von cfDNA und CTC sowie deren Einfluss auf qualitätsgesicherte Messungen bei unterschiedlichen klinisch-pathologischen Bedingungen müssen geklärt werden.
- Derzeit für Liquid-biopsy-Diagnostik angewendeten Technologien sind anfällig für Störungen und noch kaum standardisiert, was ein flächendeckendes Qualitätsmanagement erschwert.

- Weitere Liquid-biopsy-Studien mit großen Fallzahlen, direktem Bezug zur gewebebasierten molekularpathologischen Diagnostik und dem Ziel der Standardisierung sind notwendig.
- Hierfür sind in der DGP und AG Molekularpathologie entsprechende Maßnahmen zur Qualitätssicherung neuer Testverfahren bereits langjährig erprobt.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. E. Dahl

RWTH cBMB Biomaterialbank am Institut für Pathologie, Uniklinik RWTH Aachen
 Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
 edahl@ukaachen.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. E. Dahl, A. Jung, J. Fassunke, M. Hummel, R. Penzel, W. Dietmaier, S. Laßmann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Ascierto PA, Minor D, Ribas A, Lebbe C et al (2013) Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 31:3205–3211
2. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A et al (2013) Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 31(6):539–544
3. Balic M, Dandachi N, Lin H, Datar RH (2005) Cancer metastasis: advances in the detection and characterization of disseminated tumour cells facilitate clinical translation. *Natl Med J India* 18:250–255
4. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I et al (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra24
5. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N et al (2008) Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:3213–3221
6. Czyz ZT, Hoffmann M, Schlimok G et al (2014) Reliable single cell array CGH for clinical samples. *PLoS One* 9(1):e85907
7. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H et al (2013) Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368:1199–1209
8. Bono JS de, Scher HI, Montgomery RB, Parker C et al (2008) Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14:6302–6309

9. Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I et al (2012) The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486:537–540
10. Diaz LA Jr, Bardelli A (2014) Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32(6):579–586 (Epub ahead of print)
11. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K et al (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14:985–990
12. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y et al (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16368–16373
13. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW et al (2006) BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 3:551–559
14. Fehm T, Sauerbrei W (2010) Information from CTC measurements for metastatic breast cancer prognosis—we should do more than selecting an „optimal cut point“. *Breast Cancer Res Treat* 122:219–220
15. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al (2006) Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 12:4218–4224
16. Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M et al (2013) Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res* 73:2965–2975
17. Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V et al (2012) ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 23:2907–2913
18. Kin C, Kiddess E, Poultsides GA et al (2013) Colorectal cancer diagnostics: biomarkers, cell-free DNA, circulating tumor cells and defining heterogeneous populations by single-cell analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 13:581–599
19. Klein CA (2013) Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 501(7467):365–372
20. Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN et al (2009) Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 27:858–863
21. Lianidou ES, Markou A (2011) Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem* 57:1242–1255
22. Lo YM, Chiu RWK (2011) Plasma nucleic acid analysis by massive parallel sequencing: pathological insights and diagnostic implications. *J Pathol* 225:316–323
23. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D et al (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497:108–112
24. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL et al (2014) Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 20(6):1698–1705 (Epub ahead of print)
25. Pantel K, Alix-Panabières C (2013) Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 73:6384–6388
26. Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A et al (2012) Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 58:936–940
27. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C et al (2012) Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* 10:138
28. Plaks V, Koopman CD, Werb Z (2013) Cancer. Circulating tumor cells. *Science* 341:1186–1188
29. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R et al (2012) Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res* 18:2391–2401
30. Rahbari NN, Bork U, Kircher A, Nimitz T et al (2012) Compartmental differences of circulating tumor cells in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 19:2195–2202
31. Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, Uchiyama A et al (2012) Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. *Br J Cancer* 106:939–946
32. Stoecklein NH, Klein CA (2010) Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer* 126(3):589–598
33. Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9236–9241