

Liquid Biopsy beim Kolonkarzinom: Klinische Relevanz und Ausblick

Dr. med. Alexander Baraniskin, Prof. Dr. med. Wolff Schmiegel;
Medizinische Klinik, Universitätsklinikum, Knappschafts Krankenhaus, Bochum

Darmkrebs ist die dritthäufigste Krebserkrankung in Deutschland. Jährlich erkranken über 60.000 Menschen an Darmkrebs [1]. Etwa 20 bis 25% aller Patienten mit kolorektalen Karzinomen weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Metastasen auf und weitere 20% entwickeln Metastasen im weiteren Verlauf der Erkrankung [2]. Bei diesen Patienten ist die Chemotherapie in der Regel die einzige Therapieoption. Umso entscheidender ist es, dieser kritischen Patientengruppe die optimale, auf den einzelnen Patienten und seine Erkrankung zugeschnittene Therapie zu verabreichen. Liquid Biopsy kann entscheidende Hinweise bei der Auswahl der Therapie liefern.

Zur modernen Standardchemotherapie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom gehören unter anderem Antikörper gegen den sogenannten Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor. Sie blockieren gezielt das Tumorstadium. Diese Antikörper helfen aber nur denjenigen Patienten, deren Tumoren keine Mutationen im K-ras-Gen und N-ras-Gen bzw. einen Wild-

typ-RAS-Status aufweisen. Insgesamt sind dies ca. 50% aller Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen [3].

EGFR-Antikörpertherapie nur bei RAS-Wildtyp-Tumoren

Bei mutiertem RAS-Status oder bei nicht durchgeführter Bestimmung des RAS-Status ist die Verabreichung der Antikörpertherapie gegen EGF-Rezeptor nicht erfolgreich und daher nicht zugelassen. Der aktuelle Goldstandard ist die Bestimmung des RAS-Mutationsstatus aus dem Gewebe. Dafür ist die Entnahme einer Biopsie z.B. durch einen chirurgischen Eingriff oder durch eine Punktion notwendig. Eine Biopsie trägt abhängig von der Tumorlokalisation das Risiko einer Blutung, einer Organverletzung, einer Tumorzellverschleppung oder eines falsch-negativen Ergebnisses. In der Regel ist für die Durchführung einer Tumorpunktion ein stationärer Aufenthalt erforderlich. Je nach auftretenden Komplikationen belaufen sich die Kosten einer Biopsie auf 3.000,- bis 5.000,- €. Die Interpretation der Biopsie-Ergebnisse wird durch intra- und interläsionale Heterogenität des Karzinoms limitiert [4,5]. Eine Biopsie ist zwar in der Lage den Überblick über einen Ausschnitt des Tumors zu verschaffen. Jedoch werden die pathologischen Veränderungen bzw. mo-

lekulargenetischen Profile in angrenzenden Tumorzellen oder an anderen Tumormanifestationen wie Fernmetastasen, die entscheidend für die Therapiewahl sein können, nicht erfasst. Je aggressiver der Tumor wächst, desto heterogener sind die molekulargenetischen Profile der einzelnen Tumormanifestationen [5]. Um den RAS-Mutationsstatus ohne Durchführung einer Probeentnahme ermitteln zu können, wurde in den letzten Jahren eine Methode entwickelt, die die Bestimmung des RAS-Mutationsstatus aus dem Blut ermöglicht und zwar die sogenannte „Liquid Biopsy“ („Flüssigbiopsie“). Eine Liquid Biopsy lässt sich nicht-invasiv durchführen. Das molekulare Profil des Tumors kann mit der aus dem Blut der Patienten isolierten frei zirkulierenden DNA, schnell und zuverlässig charakterisiert werden.

Zirkulierende Tumor-DNA

Liquid Biopsy wird mit einem hochsensitiven Analyseverfahren durchgeführt, das unter anderem ermöglicht, kleine im Blut zirkulierende DNA-Abschnitte der Tumorzellen nachzuweisen [6].

Die Herkunft der zirkulierenden Tumor-DNA ist noch nicht abschließend geklärt. Aggressive, schnellwachsende Tumorzellen zeigen einen hohen Zellumsatz im Sinne von gesteigerter Apoptose und Nekrose.

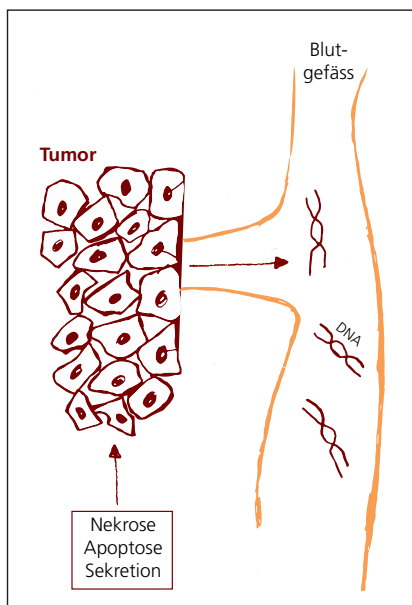


Abb. 1: Zirkulierende Tumor-DNA kann durch 3 unterschiedliche physiologische Mechanismen aus den Tumorzellen freigesetzt werden: durch Apoptose, Nekrose oder Sekretion. Welcher von den Mechanismen die führende Rolle spielt hängt von der Tumorentität, -ausbreitung und Proliferationsrate ab. [vgl. 8]

Immer wenn eine Krebszelle durch Apoptose oder Nekrose abstirbt, werden DNA-Fragmente aus der Tumorzelle freigesetzt und gelangen so als zirkulierende Tumor-DNA in die Blutbahn (► Abb. 1) [7,8]. Die zirkulierende Tumor-DNA findet sich bis auf wenige Ausnahmen bei allen Krebserkrankungen im Blut, wobei ihre Nachweiswahrscheinlichkeit wesentlich vom Tumorstadium und der Tumormasse abhängt [9]. Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen im metastasierten Stadium wird die zirkulierende DNA bei 100 % der Patienten nachgewiesen, in lokal fortgeschrittenen Stadien jedoch bei 73 % [9].

Prinzip der Liquid Biopsy

Die Menge an freier DNA, die man aus dem Plasma isolieren kann, ist sehr gering. Ihre Konzentration im Plasma liegt meist nur zwischen 1 und 100 ng/ml, so dass hochsensitive Detektionsverfahren notwendig sind, um in der gesamten zirkulierenden DNA die tumorspezifischen Mutationen nachweisen zu können. Eine Methode, die einen spezifischen Mutationsnachweis im Plasma ermöglicht, ist die sog. BEAMing Technologie [6].

BEAMing basiert auf einer Erfindung der Onkologen Bert Vogelstein und Kenneth Kinzler von Johns Hopkins University in Baltimore, USA, aus dem Jahr 2003 und steht für Beads, Emulsion PCR, Amplifikation

und Magnetic Beads. Es ist die Kombination aus Polymerasekettenreaktion (PCR) und Durchflusszytometrie (► Abb. 2) [6.]

Mittels einer Tröpfchen-PCR erfolgt bei BEAMing die Amplifikation der einzelnen Messsignale unabhängig voneinander. Es bedeutet, dass ein Messsignal einem einzigen DNA-Molekül entstammt. Diese Amplifikate werden nun als spezifische Messsignale erfasst. Je nach Häufigkeit des Messsignals müssen demzufolge viele Einzelereignisse erzeugt werden. Dies erzielt man durch ein sequenzspezifisches Fluoreszenzsignal, das dann mittels FACS-Analyse gemessen wird (► Abb. 2). Mit der BEAMing-PCR ist man in der Lage Mutationen mit Frequenzen von unter 1‰ zu detektieren [6,7]. Die aktuellen Messergebnisse zeigen, dass der Mutationsstatus aus dem Blut mit dem Mutationsstatus, der direkt aus dem Tumorgewebe bestimmt wurde, bei ca. 95% der Fälle übereinstimmt [10].

Klinischer Stellenwert der Liquid Biopsy

Dadurch, dass DNA-Spuren unterschiedlicher Krebsabsiedelungen sich im Blut nachweisen lassen, ermöglicht die Liquid Biopsy trotz der heterogenen molekularen Profile innerhalb des Tumors oder zwischen unterschiedlichen Tumormanifestationsorten eine repräsentative Charakterisierung der molekularen Veränderungen des Tumors.

In den allermeisten Fällen ist bei der Erstdiagnose des kolorektalen Karzinoms bzw. bei der Einleitung der gezielten Therapie mit Antikörpern gegen Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor eine ausreichende Menge an Tumorprimärgewebe vorhanden, um daraus die molekulare Charakterisierung im Sinne der Bestimmung des RAS-Status durchzuführen. Die Bestimmung des RAS-Mutationsstatus aus dem Blut stellt zu diesem Zeitpunkt lediglich eine Ergänzung zum Gewebe-basierten Test dar. Einen deutlich höheren Stellenwert gewinnt Liquid Biopsy in der späteren Therapiephase, und zwar während der zielgerichteten Therapie durch den Nachweis erworbener Resistenzmutationen. Denn 44-96% der Patienten mit RAS-Wildtyp entwickeln unter Therapie mit EGFR-Antagonisten RAS-Mutationen, die einen Mechanismus erworbener Resistenzen darstellen [9,11]. Beim Auftreten von RAS-Mutationen ist die Therapie mit EGF-Rezeptor-Antagonisten nicht mehr wirksam. Um diese komplexen genomischen Veränderungen detektieren zu können, war bisher die erneute Biopsie des Tumors unerlässlich. Eine frühzeitige Identifikation neuauftretender RAS-Mutationen würde dem behandelnden Arzt den Hinweis darauf liefern, dass die Therapie an das veränderte Tumorprofil angepasst bzw. umgestellt werden soll. Verglichen mit Gewebeentnahmen, die nicht

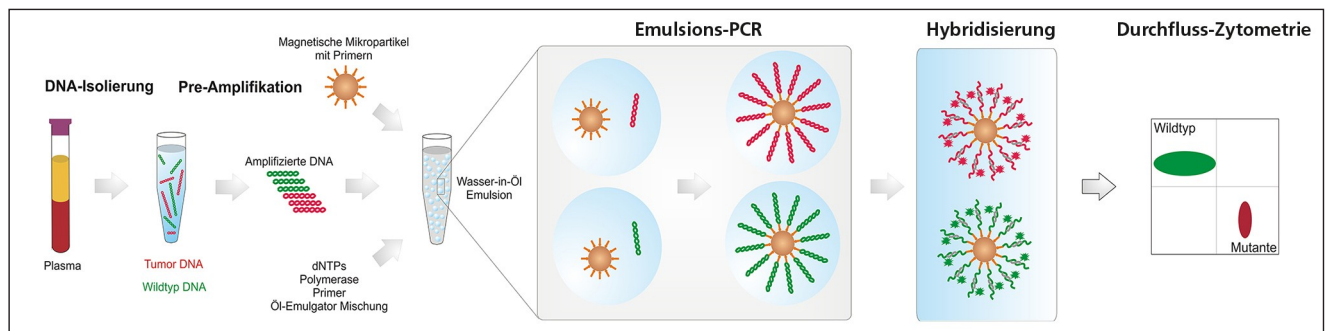


Abb. 2: Ablauf des BEAMing-Verfahrens: Aus einer Plasmaprobe wird zunächst DNA isoliert und Kopien der DNA-Zielregion werden präamplifiziert. Diese werden in Emulsionströpfchen verteilt, wo sie erneut amplifiziert werden. Daraufhin erfolgt eine sequenzspezifische Markierung der Amplifikate mit Fluoreszenz. Das Signal kann dann durchflusszytometrisch erfasst werden.

regelmäßig und sequentiell durchgeführt werden können, ist die nicht-invasive Liquid Biopsy hervorragend dafür geeignet, die dynamischen Veränderungen des Tumors zu charakterisieren.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Last der unter Anti-EGFR-Therapie erworbenen RAS-Mutationen nach Absetzen der Anti-EGFR-Therapie wieder deutlich abnimmt [12]. Dieses Phänomen ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass eine klonale Redistribution aufgrund der Therapieänderung stattfindet, weil der Selektionsdruck auf die Zellen ohne RAS-Mutation wieder abnimmt. Hiernach eröffnen sich neue Perspektiven einer erneuten Anti-EGFR-Therapie. Die sequentielle Bestimmung der RAS-Mutationslast mittels Liquid Biopsy nach Absetzen der Anti-EGFR-Therapie gibt dem behandelnden Arzt Informationen darüber, zu welchem Zeitpunkt der Einsatz der Anti-

EGFR-Therapie wieder effektiv sein kann. Noch sind klinische Studien notwendig, um zu demonstrieren, dass dieses Konzept eine Überlebensverbesserung herbeiführt.

Fazit

Die Entwicklung hochsensitiver Analyseverfahren ermöglicht den Nachweis von kleinen im Blut zirkulierenden Tumor-DNA-Fragmenten mittels Liquid Biopsy. Durch dieses nicht-invasive Verfahren ist der Arzt jederzeit in der Lage das genomische Tumorprofil oder die dynamischen klonalen Veränderungen im Tumor zu erfassen, die häufig unter einer gezielten Therapie auftreten und den Mechanismus erworbener Resistenzen offenbaren. Für den Patienten bedeutet die Etablierung der Liquid Biopsy einen Meilenstein in der individualisierten Therapie.

Literatur: www.onkologie-heute.info

Korrespondenzadresse:

Dr. med. Alexander Baraniskin,
Ruhr-Universität Bochum
Medizinische Universitätsklinik
Knappschaftskrankenhaus Bochum GmbH
In der Schornau 23-25
44892 Bochum
Tel. 0234 302-6771
Alexander.Baraniskin@ruhr-uni-bochum.de

Dr. med. Alexander Baraniskin

Medizinische
Universitätsklinik,
Knappschaftskrankenhaus Bochum



Prof. Dr. med. Wolff Schmiegel

Medizinische
Universitätsklinik,
Knappschaftskrankenhaus Bochum



cme.mgo-fachverlage.de

Das CME-Portal für Ihre zertifizierte Weiterbildung

Sichern Sie sich bis zu 4 CME-Punkte:

- Schnell und einfach registrieren auf cme.mgo-fachverlage.de
- Auswahl Ihrer CME-Fortbildung
- Fragebogen ausfüllen und abschicken

Weitere Vorteile:

- Vielfältige Fortbildungsthemen und Fachgebiete
- Gesicherte Übertragung Ihrer Punkte an die Bundesärztekammer
- Zertifikat zur bestandenen Fortbildung per E-Mail

Überzeugt?

Dann melden Sie sich jetzt an und profitieren Sie von der neuen Online-Plattform!

Neben allen Artikeln aus CMExtra finden Sie noch zertifizierte Artikel zu folgenden Fachbereichen:

- Innere Medizin
- Gynäkologie
- Orthopädie
- Allgemeinmedizin
- Chirurgie
- Pädiatrie

