

1 Das Testsystem Maintrac, das prognostische und prädiktive Aussagen für Krebspatienten aus einer Liquid Biopsy zulässt, nutzt die Anwesenheit so genannter EpCAM-Moleküle auf der Oberfläche der zirkulierenden Tumorzellen und weist sie mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper und halbautomatischer Bildanalyse nach.

Wider die Hinterlist

Der Metastasenbildung mit Fluoreszenz-gelabelten Biomarkern auf der Spur //

Zirkulierende Tumorzellen aus einer einfachen Blutprobe helfen nicht nur bei der Prognosestellung während einer Krebserkrankung. Sie können auch als zuverlässige Marker eingesetzt werden, um Medikamente auf ihre Wirksamkeit zu testen und therapierelevante Eigenschaften zu detektieren.

ANNE WESCHE*

Wenn Zellen entarten und sich deshalb in unserem Körper Tumore ausbilden, können diese gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein. Maligne Tumorzellen vermehren sich unkontrolliert, dringen in umliegendes Gewebe ein und verschaffen sich Zutritt zu Blutgefäßen und Lymphbahnen. Einige dieser Tumorzellen sind in der Lage, sich an anderer Stelle im Körper neu anzusiedeln, wo sie wieder unkontrolliert wachsen können und auf diesem Weg die Metastasen-Bildung einleiten. Anhand einer einfachen Blutprobe, der sogenannten Liquid Biopsy, lässt sich dieser Prozess verfolgen.

Über 90% der Krebsfälle gehen auf Karzinome zurück. Karzinome sind Tumore, die sich aus epithelia-

lem Gewebe entwickeln und deshalb gewebespezifische Merkmale, wie das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) auf ihrer Oberfläche tragen. Verlassen diese Zellen den Tumor und dringen in die Blutbahn ein, spricht man von zirkulierenden Tumorzellen (CTC: circulating tumor cells) oder auch von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (CETC: circulating epithelial tumor cells).

Die Dynamik ist entscheidend

In Bayreuth gilt die Aufmerksamkeit der Dynamik der CETC/CTCs im Patientenblut unter Chemo-, Immun- oder Hormontherapie bzw. unter Langzeitbeobachtung. Dr. med. Katharina und Dr. med. Ulrich Pachmann – Gründer des Unternehmens

Simfo (Spezielle Immunologie Forschung & Entwicklung) – entwickelten das Testsystem Maintrac, das prognostische und prädiktive Aussagen für Krebspatienten aus einer Liquid Biopsy zulässt. Dafür nutzen sie die Anwesenheit der EpCAM-Moleküle auf der Oberfläche der zirkulierenden Tumorzellen und weisen sie mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper und halbautomatischer Bildanalyse nach. 96% aller Karzinome präsentieren diese Moleküle, weshalb EpCAM weltweit der meistgenutzte Biomarker ist, um Tumorzellen im Blut zu identifizieren.

Der hochsensitive Test aus dem akkreditierten medizinischen Fachlabor ermöglicht den Nachweis von

* A. Wesche: Life Sciences-PR, 27419 Kalbe, Tel. +49-160-4013471

LP Tipp+
mehr zum Thema:

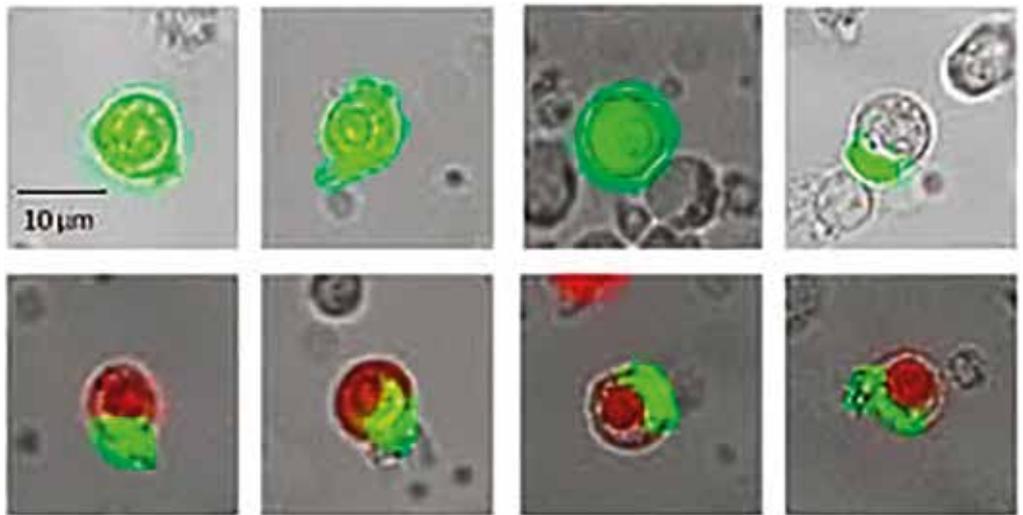
- Mehr zu diesem Thema finden Sie unter dem Stichwort **Liquid Biopsy** auf www.laborpraxis.de.
- Kongresse, Konferenzen und Veranstaltungen, auf denen Simfo über neue Möglichkeiten der **Krebsdiagnostik** informiert, finden Sie unter www.simfo.de/News/veranstaltungen/.

CETC/CTCs aus einer Blutprobe schon bevor eine Metastasierung aus einem Primärtumor erfolgt ist. Sobald der Tumor eigene Blutgefäße ausbildet, um sich optimal mit Nährstoffen zu versorgen, können seine Zellen aktiv in den Blutkreislauf abwandern und mittels Maintrac bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung detektiert werden.

Wichtig für den Test ist, dass die Probe innerhalb von 48 bis 72 Stunden nach der Blutabnahme im Transfusionsmedizinischen Zentrum Bayreuth (TZB) eintrifft, damit die Ergebnisse nicht durch absterbende Tumorzellen verfälscht werden, die eine allzu lange Transportzeit nicht überlebt haben. Für die Untersuchung werden aus der 15 ml umfassenden Blutprobe zunächst die Erythrozyten lysiert. Leukozyten beeinflussen die Messung nicht, da sie als Zellen des blutbildenden Systems nicht den Gewebemarker EpCAM tragen. Die verbleibenden Zellen werden in gepufferter Salzlösung aufgenommen, verdünnt und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen das spezifische Oberflächenmolekül EpCAM inkubiert. Anschließend wird der Fluoreszenz-Farbstoff Propidium-Iodid zur Sichtbarmachung abgestorbener Zellen hinzugefügt. Die Messung findet mit einem Fluoreszenz-Mikroskop, dem Scan R von Olympus, statt. Nur vitale, EpCAM-positive Zellen mit unauffälliger Morphologie werden durch die Scan R Analysesoftware erfasst, gezählt und ausgewertet (s. Abb. 2).

Prognose in Echtzeit

Der erste Wert der Messung wird als Basiswert gesetzt, denn jeder Patient hat seinen eigenen individuellen Schwellenwert. Die Zellzahlen werden über einen Zeitverlauf von mehreren Wochen, Monaten oder sogar Jahren miteinander verglichen und geben Aufschluss über die Tumoraktivität, denn die Anzahl der CETC/CTCs korreliert direkt mit dem Tumorwachstum. Eine Erhöhung der Zellzahl deutet auf eine verstärkte Tumoraktivität hin und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Eine Abnahme der CETC/CTCs hingegen weist auf eine erfolgreiche Behandlung und eine gute Prognose



2 Beispiele für lebende und tote Zellen aus einer Patientenprobe. Oben: Zellen leuchten grün, wenn sie das EpCAM-Molekül tragen. Unten: Zellen, bei denen der Propidium-Iodid-Farbstoff durch die beschädigte Kernhülle eindringen konnte und somit die abgestorbenen Zellen markiert.

hin (s. Abb. 3). Am Beispiel von Brustkrebspatientinnen wurde gezeigt, dass die Frauen, die eine deutliche Verringerung der CETC/CTCs aufwiesen, seltener ein Rezidiv entwickelten [1].

Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, sich unter Therapie zu verändern oder sich nach Abschluss der Behandlung wieder zu vermehren. Deshalb ist es sinnvoll, eine dauerhafte Überwachung der CETC/CTCs durchzuführen, um durch einen erneuten Anstieg der Zellzahl eine erneute Tumoraktivität frühzeitig zu erkennen.

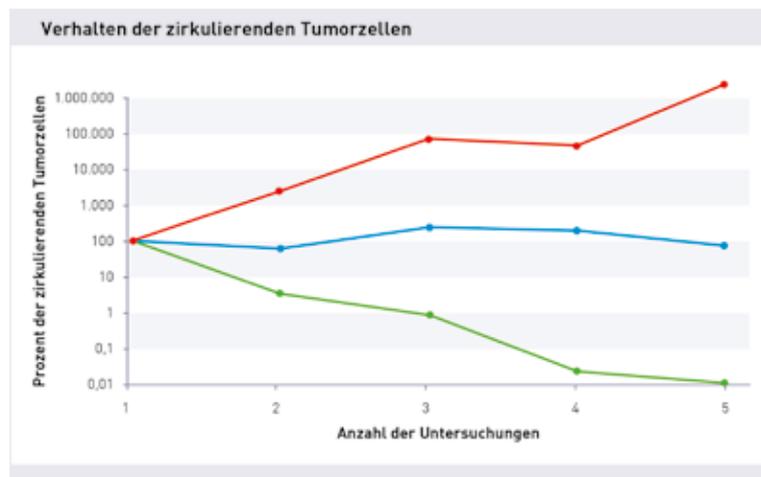
Therapeutische Testung

Die Medikation wird üblicherweise durch pathologische Untersuchungen des Tumors oder der Metastase

bestimmt. Die Tumor-Eigenschaften sind von Patient zu Patient verschieden und beeinflussen maßgeblich die Therapie.

In Bayreuth wird getestet, welcher Wirkstoff effektiv den programmierten Zelltod (Apoptose) in den CETC/CTCs auslöst und damit die Zahl der Tumorzellen reduziert. Therapien mit im Vorwege nachgewiesenen effektiven Wirkstoffen ersparen den Patienten starke Nebenwirkungen von Medikamenten, die gar nicht wirken können, weil sie nicht gegen die ganz individuellen Tumoreigenschaften und die Empfindlichkeit der Tumorzellen gerichtet sind.

Im Labor werden Chemosensitivitäts-Testungen direkt im Patientenblut durchgeführt, um realistische Situationen darzustellen. Das funktioniert gut, allerdings nur mit



3 Verhalten der zirkulierenden Tumorzellen. Über einen Zeitverlauf von mehreren Wochen wird die Dynamik der CETCs verfolgt. Rote Kurve: Anstieg der CETCs, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Blau: keine Veränderung. Grün: Abnahme der Zellzahl und damit Reduktion der Tumoraktivität.


LP Info
Dr. Ilka Ottleben, Redakteurin

RELEVANTE BEGRIFFE

- **CETC:** zirkulierende epitheliale Tumorzellen (circulating epithelial tumor cells)
- **CTC:** zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells)
- **EpCAM:** epitheliales Zelladhäsionsmolekül (epithelial cell adhesion molecule)
- **Apoptose:** von der Zelle selbst ausgelöster Zelltod
- **Her2/neu:** Wachstumsfaktor-Rezeptor (human epidermal growth factor receptor 2), der bei übermäßigem Vorkommen die Zelle mit Wachstumssignalen überflutet.

Wirkstoffen, die intravenös verabreicht werden können. Oral eingenommene Präparate durchlaufen verschiedene Stufen der Metabolisierung, bevor die Wirkstoffe schließlich in der Blutbahn ankommen. Deshalb ist für sie die Maintrac-Sensitivitätstestung nur bedingt geeignet. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass ausschließlich cytotoxische Substanzen getestet werden können, die also direkt die Tumorzellen angreifen, ohne dass sie über andere Mechanismen ihre Wirkung entfalten.

Aus einer Blutprobe werden CETCs/CTCs wie vorher schon beschrieben, zusammen mit den Leukozyten isoliert und über verschiedene Zeiträume mit der zu testenden Substanz inkubiert. Der Wirkstoff wird dafür in einer Konzentration eingesetzt, die einer Therapie-Tagesdosis entspricht. Beim anschließenden Monitoring wird die Absterbe-Rate der Tumorzellen im Vergleich zu einer Probe ohne Wirkstoff berechnet. Färbt sich bei der Fluoreszenzmessung der

Zellkern durch das Propidiumiodid rot, hat die Zelle die Apoptose eingeleitet und stirbt ab. Für dieses Therapeutikum ist eine Wirkung nachgewiesen. Zeigt sich keine Rotfärbung in den Zellkernen, interagiert der Wirkstoff nicht mit den CETC/CTCs, was bedeutet, dass das Therapeutikum höchstwahrscheinlich für diesen Patienten wirkungslos ist (s. Abb. 4).

Dieser Test kann auch therapiebegleitend als Erfolgskontrolle durchgeführt werden, um zu beobachten, ob sich möglicherweise Resistenzen in den Tumorzellen unter diesem Wirkstoff entwickeln und das Medikament damit seine anfängliche Wirksamkeit verliert. Allerdings sehen die medizinischen Leitlinien einen Wechsel der Medikation aufgrund eines Anstiegs von CETC/CTCs bisher noch nicht vor. Dabei verspricht eine individuelle medikamentöse Therapie dem Patienten die höchste Wahrscheinlichkeit, möglichst lange rezidivfrei und mit einer hohen Lebensqualität zu leben [2].

Beitrag zur Personalisierung

Der Trick der Krebszellen, sich durch genetische Veränderung der Behandlung zu entziehen und Resistenzen auszubilden, stellt Ärzte und Forschende gleichermaßen vor große Herausforderungen. Die Aggressivität und Resistenzausbildung der Metastasen sind das zentrale Problem, denn 90% aller Todesfälle sind nicht durch den Primärtumor bedingt, sondern durch die Metastasierung.

Ist z. B. ein Primärtumor einer Brustkrebspatientin anfänglich auf Her2/neu negativ getestet worden, können die Metastasen sehr wohl die Her2-Rezeptor-Synthese ver-

stärkt einleiten und ein Her2/neu positives Rezidiv bilden. Her2/neu ist ein Rezeptor an der Zelloberfläche, der bei übermäßigem Vorkommen die Zelle mit Wachstumssignalen überflutet. Diese Art von Brustkrebs ist sehr aggressiv. Ein Test der CETC/CTCs verschafft Gewissheit über die genetische Veränderung und die Patientin kann von einer zielgerichteten Behandlung profitieren. Mit Maintrac können weitere therapierelevante Eigenschaften für Hormonrezeptoren, Mutationen und neuerdings auch Checkpoint-Inhibitoren für die Immuntherapie getestet werden. Zirkulierende Tumorzellen können somit gut als prädiktiver Marker eingesetzt werden.

Theorie und Praxis

Eine solche personalisierte Onkologie hat sich in der klinischen Praxis noch nicht etabliert. Wenn Arzt und Patient aber ein gutes Vertrauensverhältnis haben und neben den medizinischen Leitlinien zusätzlich Seitenwege betreten wollen, können sie gemeinsam diagnostische Möglichkeiten ausschöpfen, die zwar noch nicht durch große medizinische Studien Einzug in den Behandlungskatalog erhalten haben, die aber, wie der Maintrac-Test, eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen und deswegen durchaus als Begleittest aussagekräftig sind. Eine entsprechende Therapieanpassung kann den Patienten nachweislich einen signifikanten Überlebensvorteil bringen. Die Maintrac-Diagnostik ist aktuell noch keine Kassenleistung und gilt als Individuelle Gesundheitsleistung (IGeL). Auf Anfrage übernehmen jedoch einige Krankenkassen die Kosten. ■

Literaturtitel

- [1] Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1208-15.
- [2] Krüger, N et al. Chemosensitivitätstestung von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (Circulating epithelial Tumor Cells, CETCs) in Vitro: Korrelation zur in Vivo Sensitivität und den klinischen Ergebnissen. *J Cancer Therapy*, 2013

4 Therapeutische Wirkstofftestung. Grün markiert die EpCAM-Moleküle. Der rote Farbstoff zeigt die Auflösung des Zellkerns und damit das Absterben der Zelle an. Das Medikament wirkt und senkt die Tumoraktivität.

