

Das Potenzial von Liquid Biopsy in der Diagnostik und Früherkennung des Pankreaskarzinoms

L.-M. Philipp, A. Brauer, M. Carstensen, S. Sebens, Institut für Experimentelle Tumorforschung, UKSH Kiel, Kiel

Das Pankreaskarzinom wird aufgrund unspezifischer Symptome und fehlender Frühdiagnostik häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Dieses trägt erheblich zur ungünstigen Prognose dieses Tumors bei, sodass neue Technologien zur Früherkennung zwingend erforderlich sind. Liquid Biopsies (LB) aus verschiedenen Körperflüssigkeiten sind zunehmend in den onkologischen Fokus gerückt, da in diesen verschiedene Biomarker zur Tumordetektion genutzt werden können. Trotz vielversprechender Ergebnisse weist die Nutzung von LB noch Limitationen auf, da besonders in frühen Krankheitsstadien oder bei geringer Tumormasse oft kein verlässlicher und spezifischer Tumornachweis erfolgen kann. Aktuelle Forschungsprojekte arbeiten daran, verschiedene Biomarker in LB für die Früherkennung des Pankreaskarzinoms zu testen, um diese Technologie in die klinische Anwendung zu bringen.

Einleitung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist die häufigste Form des Pankreaskarzinoms. Im Jahr 2020 erkrankten in Deutschland etwa 20.000 Personen an einem PDAC und aufgrund der schlechten Prognose verstarben auch fast ebenso viele an dieser Erkrankung [1, 2]. Diese ungünstige Prognose basiert auf der nahezu symptomfreien Entwicklung des PDAC, fehlender Frühdiagnostik sowie der nach wie vor schlechten Therapierbarkeit [3-6]. Eine Lösung hierfür würde eine zuverlässige Methode zur Früherkennung bieten, welche bereits in frühen Krankheitsstadien sowie bei geringer Tumormasse spezifische Tumormarker detektieren kann. Dies ist auch von besonderem Stellenwert bei der Überwachung und Risikostratifikation von Personen mit einem hereditären Risikoprofil, von Patient:innen mit Vorläuferläsionen wie der intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie (IPMN) oder einer chronischen Pankreatitis (CP) sowie Hochrisikopatient:innen, wie z.B. Patient:innen mit einem neu diagnostizierten Diabetes mellitus [7]. Des Weiteren ist eine Überwachung von Tumormarkern bei PDAC-Patient:innen während bzw. nach Krebstherapie notwendig, um Rezidive früher erkennen und damit besser behandeln zu können. Auch bei der Therapieentscheidung können Tumormarker eine wichtige Rolle spielen [8]. Eine Technologie,

die diesbezüglich in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit erlangt hat, ist die der LB. Diese können aus unterschiedlichen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Pankreassaft oder Aszites gewonnen werden, wobei eine Blutuntersuchung aktuell den größten Informationsgewinn bietet [9]. Ferner hat diese Methode den Vorteil, minimalinvasiv zu sein und dadurch regelmäßig und ohne größere Belastung für Patient:innen durchgeführt werden zu können.

Potenzielle Tumormarker in LB sind zirkulierende Tumorzellen (CTC), zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA), RNAs, extrazelluläre Vesikel (EV) oder auch Proteine. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte jedoch noch kein ausreichend sensitiver und spezifischer Biomarker in LB für die Früherkennung des PDAC identifiziert werden [10]. Der aktuell klinisch genutzte Tumormarker Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA19-9) ist für die Diagnose eines PDAC nicht ausreichend spezifisch, sodass auch bei einem CA19-9-Nachweis weitere Diagnostik nötig ist [11]. Ein grundlegendes Problem bei LB ist jedoch, dass in frühen Krankheitsstadien die Spiegel der Tumormarker ggf. zu niedrig sind und ein Tumor damit erst spezifisch in höheren Tumorstadien detektiert werden kann, wenn auch der/die Tumormarker erhöht ist/sind. Die Tatsache, dass das PDAC nur selten in frühen Krankheitsstadien diagnostiziert wird, erschwert

die Identifikation eines geeigneten Tumormarkers, da hierfür große Patientenkohorten mit unterschiedlichen Krankheitsstadien sowie Kontrollkohorten benötigt werden, um verlässliche und spezifische Marker identifizieren zu können. Bisherige LB-Studien im PDAC brachten zwar neue Erkenntnisse, zeigten jedoch auch die Limitationen bei der Untersuchung einzelner Tumormarker auf und schafften es nicht, diese in die klinische Routine für die Diagnostik und Tumormarker-basierte Therapie zu integrieren [12-14].

Ein vielversprechendes Konzept für eine verlässliche Frühdiagnostik könnte daher der Kombinationsnachweis von mehreren Tumormarkern in (verschiedenen) LB darstellen.

In diesem Artikel werden verschiedene Arten von Biomarkern in Blut-basierten LB und deren potenzieller Nutzen für die Früherkennung des primären PDAC sowie von Rezidiven vorgestellt, das Potenzial und die Limitationen von LB und den Biomarkern aufgezeigt, sowie aktuelle Projekte vorgestellt, die diese vielversprechende Technologie weiter in die klinische Anwendung bringen sollen (Abb. 1).

Proteine als Biomarker in Liquid Biopsies

Zahlreiche Proteine sind als Biomarker für die Detektion des PDAC getestet

worden, wobei CA19-9 der aktuell klinisch in der Diagnostik genutzte Biomarker ist [15]. Erhöhte CA19-9-Werte alleine lassen jedoch nicht ausschließlich auf ein PDAC schließen, sondern können auch ein Hinweis auf andere maligne sowie nicht-maligne gastrointestinale Erkrankungen sein [11]. Daher ist eine Erhöhung dieses Wertes immer im Zusammenhang mit klinischen Befunden und bildgebenden Verfahren zu betrachten. Beim lokalen PDAC korreliert der CA19-9-Wert mit dem Tumorstadium, einer erfolgreichen Resektion des Tumors, einem erhöhten Risiko eines Rezidivs und dem Überleben der Patient:innen [16, 17]. Außerdem kann eine Überwachung von CA19-9 Aufschluss über die Therapieeffizienz liefern, da z.B. eine therapiebedingte Verringerung des CA19-9-Wertes mit der Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Tumorreduktion korreliert [18]. Jedoch gibt es auch Patient:innen, die kein CA19-9 sezernieren, wodurch falsch-negative Testresultate entstehen [19]. Um daher eine eindeutige und vor allem frühe Diagnose eines PDAC stellen zu können, ist die Identifikation und Nutzung anderer Tumormarker notwendig.

Als weitere Proteinmarker für die Diagnose eines PDAC wurden u.a. Galektine (Gal), Thrombospondin-2 (THBS2), Leucin-rich alpha-2 glycoprotein 1 (LRG1) und Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) im Blut getestet. Bisherige Studien zeigten, dass diese Proteinmarker zur Differenzierung zwischen gesunden Proband:innen, Patient:innen mit einer CP und Patient:innen mit verschiedenen Stadien des PDAC beitragen und in Kombination mit CA19-9 teils eine höhere Spezifität als CA19-9 alleine aufweisen [20-22].

Zur Erstellung einer Prognose und zur Überwachung des Therapieansprechens wurden weitere Studien zum Nutzen von Carcinoembryonalem Antigen (CEA) und dem Cancer-Antigen 125 (CA125) durchgeführt. CEA wird hauptsächlich für die Diagnose des Kolonkarzinoms verwendet, jedoch korreliert eine hohe CEA-Expression auch mit einem schlechten Überleben bei PDAC-Patient:innen

[23], wobei CA19-9 eine höhere Sensitivität aufweist [24]. Eine andere Studie zeigte weiterhin eine Korrelation von CA125 und der Anwesenheit von Metastasen [25].

Die meisten Proteinbiomarker, wie auch der in der Klinik aktuell verwendete Marker CA19-9, haben sich bisher jedoch alleine nicht als spezifisch genug für die Diagnostik des PDAC erwiesen, sodass die Detektion von mehreren Proteinen sinnvoll erscheint, um die Sensitivität und Spezifität der Diagnostik zu erhöhen. Eine multizentrische Studie, die eine Identifikations- und Validierungskohorte umfasste, zeigte, dass 4 Metabolite in Kombination mit CA19-9-Spiegeln im Serum mit einer Sensitivität von 77,3% und Spezifität von 89,6% eine verlässliche Methode zur Diskriminierung eines PDAC von einer CP ist [26]. Erste Studien, in denen Zytokine und Entzündungs-assoziierte Proteine im Serum analysiert wurden, weisen darauf hin, dass bestimmte Proteinsignaturen geeignet sind, frühe PDAC-Stadien nachzuweisen und von Kontrollproband:innen diskriminieren zu können [27] bzw. im Serum von operablen PDAC-Patient:innen prognostische Aussagen für den postoperativen Verlauf zu erlauben [28, 29].

Vielversprechende Ergebnisse aus einer aktuellen Studie zeigen, dass die Blut-basierte Detektion einer Kombination aus 5 Proteinen und 3 mikroRNA (miRNA) für die Diagnose und Risikostratifikation von Patient:innen mit IPMN genutzt werden kann [30, 31]. Die Detektion von tumorspezifischen molekulargenetischen Faktoren in LB stellt eine weitere Möglichkeit für die Nutzung von Biomarkern in der PDAC-Diagnostik und der -Rezidivüberwachung dar.

ctDNA und ctRNA als Biomarker in Liquid Biopsies

Tumorzellen können zellfreie DNA-Fragmente (cfDNA) in die Blutbahn abgeben. Ebenso können DNA-Fragmente (ctDNA) durch Nekrose oder Apoptose der Tumorzellen freigesetzt werden [32]. PDAC-Zellen weisen häufig Mutationen in Genen wie KRAS, dem Epidermal Growth Factor

Receptor (*EGFR*), *TP53*, *CDKN2A* und *SMAD4* auf, welche durch Sequenzierung der DNA aus LB nachgewiesen werden können [33, 34]. Hierbei korreliert das Auftreten von *KRAS*-Mutationen mit dem allgemeinen Überleben der Patient:innen und ist teilweise mit dem Auftreten von Mikrometastasen assoziiert [33, 35, 36]. Während ca. 90% der PDAC-Gewebe zwar eine *KRAS*-Mutation aufweisen, zeigten bisherige Studien zum Nachweis dieser Mutation in cfDNA jedoch große Variationen [37]. In der laufenden PAC3-Studie werden daher Veränderungen der Genmutationen im Verlauf der Chemotherapie untersucht. Dies soll dazu beitragen, den Krankheitsverlauf anhand der Mutationen in cfDNA zu überwachen [38]. Des Weiteren untersuchen Studien wie die DYNAMIC-pancreas (ACTRN12618000335291) oder PROJECTION (ML40429; <https://www.aio-portal.de/studie/97--projection.html>) die Korrelation von ctDNA mit dem Auftreten von Rezidiven innerhalb von 2 Jahren bzw. der Korrelation von präoperativer ctDNA mit einem PDAC-freien Überleben.

Neben ctDNA kann auch zirkulierende Tumor-RNA (ctRNA) in LB nachgewiesen werden. Hier haben sich Studien meist auf miRNAs fokussiert [39]. Diese interagieren mit der mRNA und können auch in EV enthalten sein. Wie oben erwähnt, hat eine kürzlich publizierte Studie ein Panel aus 5 Proteinen und 3 miRNAs im Blut identifizieren können, die eine Unterscheidung eines PDAC von Vorläuferläsionen bzw. gesundem Gewebe ermöglicht [30]. Auch wenn diese Ergebnisse noch in einer größeren unabhängigen Studie validiert werden müssen, stellt dieser Ansatz eine vielversprechende Strategie für die Früherkennung des PDAC dar.

EV als Biomarker in Liquid Biopsies

EV sind Partikel mit Lipiddoppelmembran, welche Nukleotide, Proteine und weitere bioaktive Substanzen enthalten [40]. Physiologisch produzieren alle Körperzellen EV, um mit benachbarten Zellen kommunizieren und phänotypische Veränderungen auslösen

zu können. Dies ist ebenfalls relevant für die Tumormikroumgebung (TMU) des PDAC, in welcher EV produziert werden, die sich von physiologischen unterscheiden. Diese Tumor-assoziierten EV spielen eine wichtige Rolle in der Kommunikation der Tumorzellen untereinander sowie mit Zellen der TMU wie Krebs-assoziierten Makrophagen und Fibroblasten. Dies kann zu einem aggressiven, invasiven und immunsuppressiven PDAC führen und das Therapieansprechen beeinflussen [41-43].

EV werden auch in das Blut abgegeben und können daraus isoliert und charakterisiert werden. Ihre molekularen und biochemischen Bestandteile können als Biomarker genutzt werden. EV haben aufgrund hoher Sensitivität großes Potenzial in der Früherkennung des PDAC. Obwohl die geringe Abundanz der Krebs-assoziierten im Vergleich zu physiologischen EV eine Herausforderung darstellt, sind EV stabiler und einfacher als vergleichsweise CTC zu isolieren. Da allerdings nur einige bioaktive Moleküle in den EV enthalten sind, sind die ableitbaren Informationen limitierter.

Gerade die Analyse der in EV enthaltenen RNA hat hohes Potenzial für die Früherkennung von PDAC. In einer multizentrischen Studie mit Validierungskohorte konnte ein Panel aus 8 EV-miRNA genutzt werden, um mit hoher Sensitivität und Spezifität gesunde Proband:innen von Patient:innen mit einem PDAC in Stadien 1 und 2 zu unterscheiden. Dies gelang auch für einige Patient:innen mit Tumoren, die negativ für freies CA19-9 oder ctRNA waren [44]. Auch die Erkennung von Vorläuferläsionen gelang über die Analyse der in EV enthaltenen Protease ADAM8 [45]. Weiterhin könnten mithilfe der in EV enthaltenen DNA auch Analysen von genomischen PDAC-Mutationen wie z.B. KRAS erfolgen, um darüber nachfolgende Therapieentscheidungen steuern zu können [46].

CTC als Biomarker in Liquid Biopsies

Bei der Metastasierung eines soliden Tumors disseminieren einzelne Krebszellen vom Primärtumor in die lokale TMU, können dann in die Blutbahn gelangen und sich in sekundären Organen ansiedeln. Dieser Prozess findet

ausgesprochen oft statt, sodass jeden Tag mehrere Millionen Krebszellen pro Gramm Tumor in das Blut gelangen. Die überwiegende Mehrheit dieser CTC wird jedoch durch das Immunsystem erkannt und eliminiert, oder durch Scherkräfte in der Blutbahn zerstört, sodass nur ein kleiner Anteil überlebt [47]. Die resultierende Anzahl nachweisbarer CTC kann im fortgeschrittenem PDAC-Stadium bei über 100 Zellen je Milliliter Blut liegen, befindet sich bei den meisten Patient:innen aber eher im Bereich von weniger als 1 bis 10 [48].

Die Isolation von CTC kann über verschiedene Methoden erfolgen, wobei das CELLSEARCH®-System die bisher einzige von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassene Komplettlösung für die Isolierung und Quantifizierung von CTC ist. Tumorzellen werden hierbei über den Oberflächenmarker EpCAM (Epitheliales Zelladhäsionsmolekül) sortiert und anschließend über Immunfluoreszenz- und Kernfärbungen weiter charakterisiert. Die Anwendung dieser Methode ist limitiert und bisher nur für bestimmte Krebserkrankungen zugelassen [49]. Zu berücksichtigen ist, dass einerseits die EpCAM-Expression auf den Tumorzellen im Laufe der Tumorprogression reduziert sein oder ganz verloren gehen kann, andererseits das Protein kein Tumor-spezifischer Marker ist, sodass mit dieser Methode auch zirkulierende Epithelzellen detektiert werden können, die z.B. im Rahmen von benignen Pankreaserkrankungen in die Blutbahn gelangen [50]. Die Entwicklung anderer Verfahren, über die CTC Marker-unabhängig isoliert werden können, ist daher von großer Bedeutung, da CTC das größte Potenzial für die Charakterisierung der Krebseigenschaften bieten, auf deren Basis Prognosen und Therapieentscheidungen getroffen werden können. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass PDAC-Patient:innen mit einer hohen Anzahl an CTC im Blut ein höheres Risiko für Metastasen- und Rezidivbildung nach Therapie sowie ein kürzeres Gesamtüberleben haben [51-53]. Neben der Quantifizierung der CTC, die im Verlauf einer Therapie Anhaltspunkte über deren Effektivität liefern kann, können weitere Analysen mit den CTC erfolgen, z.B.

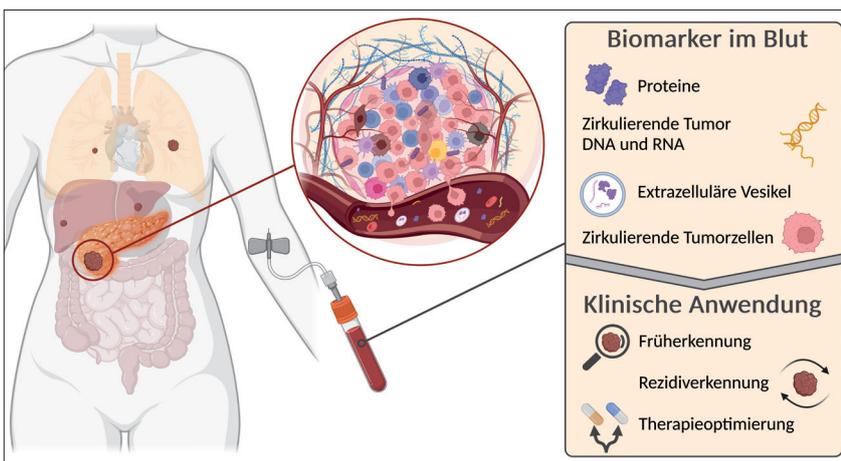


Abb. 1: Schematische Darstellung des Liquid Biopsy-Verfahrens aus dem Blut einer Person mit duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC). Die Abbildung zeigt eine Person mit (metastasiertem) PDAC (links) und ein Beispiel für die heterogene Beschaffenheit eines damit einhergehenden Tumors (Mitte). PDAC setzen sich aus unterschiedlichsten Krebszellpopulationen und einem ausgeprägten Tumorstroma zusammen, wodurch eine Vielzahl von Biomarkern in die Blutbahn abgegeben werden. Mithilfe einer Blutentnahme, der Liquid Biopsy, können diese Biomarker, wie z.B. Proteine, zirkulierende Tumor-DNA und -RNA, extrazelluläre Vesikel oder zirkulierende Tumorzellen analysiert und für die Früh- oder Rezidiverkennung sowie Therapieoptimierung genutzt werden (rechts). mit BioRender.com erstellt

der Morphologie, des Transkriptoms, Proteoms und Genoms, um eine bessere Risikoeinschätzung und Auswahl effektiver Immun- und Chemotherapien zu ermöglichen [47]. Die Sensitivität der CTC zum Krebsnachweis ist jedoch, gerade in frühen Stadien, geringer als über den Nachweis anderer LB-Biomarker. Besonders im PDAC liegt selbst bei fortgeschrittener Erkrankung die Detektion von CTC im Blut bei lediglich 65% [51]. Gleichzeitig hat der Nachweis der CTC, verglichen mit dem von EV, ctDNA oder RNA, die höchste Spezifität [9].

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich bisher die Nutzung von CTC in der Früherkennung von Krebserkrankungen und speziell des PDAC als schwierig erweist. Die alleinige Anwendung dieser Methode zur sensitiven und spezifischen Detektion eines PDAC, vor allem im Frühstadium, ist bisher noch nicht geeignet und erfordert die Weiterentwicklung dieser Technologie sowie Ergänzung durch weitere Biomarker.

Zusammenfassung und Ausblick

Die LB wurde in den letzten Jahren für die Nutzung für Diagnose und Therapieoptimierung von Krebspatient:innen intensiv beforscht und es sind große Fortschritte gemacht worden, um diese Technologie für ihre unterschiedlichen Einsatzgebiete weiterzuentwickeln. Für die klinische Anwendung sind neben der Identifikation eines Biomarkers bzw. einer Biomarkerkombination mit hoher Spezifität und Sensitivität standardisierte Isolations- und Detektionsmethoden sowie die Definition von klinisch relevanten Markerkonzentrationen erforderlich. Diese müssen

in großen multizentrischen Studien (inkl. Validierungskohorten) ermittelt und validiert werden. Der Einsatz von LB in der Krebsfrüherkennung ist dabei besonders herausfordernd, da aufgrund der niedrigen Tumormast die zu erwartenden Konzentrationen von Tumor-spezifischen Markern niedrig sind, gleichzeitig aber eine klare Abgrenzung zu nicht-neoplastischen Erkrankungen notwendig ist. Im Fall des PDAC könnte jedoch ein LB-basierter Früherkennungstest eine große Wende in der Verbesserung der Prognose für PDAC-Patient:innen bedeuten, da eine frühzeitige Detektion des Tumors die Chancen auf eine erfolgreiche Behandlung erheblich steigern würde. In 2023 sind 2 große EU-geförderte Verbundprojekte begonnen worden, in denen unter Einbindung von mehreren Zentren und Expertisen unterschiedliche Parameter im Blut von entsprechend großen Patientenkohorten detektiert werden sollen. Im Projekt GUIDEMRD wird untersucht, inwiefern die Detektion von ctDNA im Blut von Krebspatient:innen, u.a. mit PDAC, zu einer früheren Detektion von Rezidiven nach operativer Entfernung des Primärtumors und damit einer Therapieoptimierung beitragen kann (www.guidemrd-horizon.eu). Das Projekt PANCAID hat zum Ziel, einen Blut-basierten Früherkennungstest für das PDAC zu entwickeln, wofür unterschiedliche Biomarkerarten (Proteine, EV, cfDNA, CTC) bestimmt und ihre klinische Wertigkeit allein und in Kombination getestet wird (www.pancaid-project.eu). Beide Projekte stellen einen großen Schritt dar, mithilfe der LB die Früherkennung und damit die Behandlungsmöglichkeiten und Prognose von PDAC-Patient:innen zu verbessern.

Es besteht kein Interessenkonflikt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (GRK2501/0) sowie der Stiftung für Krebsentstehung und Immunologie für die Unterstützung unserer Arbeit.

Die Literatur finden Sie unter:
www.med4u.org/29704

AUTORIN

Dr. rer. nat. Lisa-Marie Philipp

Institut für Experimentelle
Tumorforschung, CAU Kiel,
UKSH Kiel
Arnold-Heller-Straße 3
24105 Kiel

Tel.: 0431/500-30519

E-Mail: lisa.philipp@email.uni-kiel.de



AUTORIN

Annika Brauer M.Sc.

Institut für Experimentelle
Tumorforschung, CAU Kiel,
UKSH Kiel
Arnold-Heller-Straße 3
24105 Kiel

Tel.: 0431/500-30519

E-Mail: annika.brauer@email.uni-kiel.de



AUTOR

Malte Carstensen M.Sc.

Institut für Experimentelle
Tumorforschung, CAU Kiel,
UKSH Kiel
Arnold-Heller-Straße 3
24105 Kiel

Tel.: 0431/500-30519

E-Mail: malte.carstensen@email.uni-kiel.de



AUTORIN

**Prof. Dr. rer. nat.
Susanne Sebens**

Institut für Experimentelle
Tumorforschung, CAU Kiel,
UKSH Kiel
Arnold-Heller-Straße 3
24105 Kiel

Tel.: 0431/500-30501

E-Mail: susanne.sebens@email.uni-kiel.de



Lesen Sie mehr zum Thema:

Mutationsanalysen aus dem Blut

Die Liquid Biopsy ist eine elegante Methode. Ein Röhrchen Blut auf Tumorzellen oder Tumorzell-DNA untersuchen und schon ist der Krebs oder das Rezidiv entdeckt bzw. molekular charakterisiert? So einfach es klingt, so komplex sind diese hochsensitiven Nachweismethoden. Welche Liquid Biopsy-Analysen in der klinischen Praxis bereits einsetzbar sind, und wo es noch fehlt, verrät Prof. Dr. Klaus Pantel, Hamburg, im Interview mit JOURNAL ONKOLOGIE.

www.med4u.org/29563

