

J. Kiefer, G. B. Stark, S. U. Eisenhardt, Klinik für Plastische und Handchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, D. Braig, Klinik für Hand-, Plastische und Ästhetische Chirurgie, Klinikum der Universität München, LMU München.

16. September 2020

Liquid Biopsy-Diagnostik bei Sarkomen

Knochen- und Weichgewebssarkome sind seltene, maligne Tumoren mesenchymalen Ursprungs, die überwiegend dem Stütz- und Bindegewebe entstammen. Etwa 50% der Patienten mit Sarkomen erfahren ein lokales Tumorrezidiv oder Metastasen und ca. 30% der Patienten versterben innerhalb der ersten 10 Jahre nach Diagnosestellung. Diagnostische und therapeutische Entscheidung basieren zunehmend auf molekulargenetischen Untersuchungen des jeweiligen -Tumors. Sarkome umfassen eine Vielzahl an histologischen Subtypen und zeigen auf molekularer Ebene eine hohe Diversität. Durch Apoptose und Nekrose von Zellen gelangt freie, fragmentierte DNA (cfDNA) in die periphere Zirkulation. Ein Bruchteil davon stammt aus Tumorzellen und besteht aus tumorspezifischer DNA (ctDNA), die im Sinne einer Liquid Biopsy für die genomische Analyse von Sarkomen verwendet werden kann. Die Heterogenität und Diversität somatischer Veränderungen bei Sarkomen stellt jedoch eine Herausforderung für Nachweisverfahren dar. Wir stellen in dieser Übersicht daher das analytische Potenzial von Liquid Biopsies bei Sarkomen dar mit besonderem Fokus auf die technologischen Herausforderungen an die Analyseverfahren und klinische Ansätze in Diagnostik und Therapie.

Zu diesem Artikel ist auch ein CME-Test verfügbar.

[Hier kommen Sie direkt zur Teilnahme](#)

(verfügbar bis zum 15.12.2021)

Um alle Fragen des CME-Tests beantworten zu können, lesen Sie dazu auch folgenden Artikel:

[Angiosarkome - eine heterogene vaskuläre Neoplasie mit variabler klinischer Präsentation](#)

Sarkome zeichnen für ca. 15% der pädiatrischen und 1% der adulten Krebs-erkrankungen verantwortlich (1, 2).- Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorentitäten sind jüngere Patienten häufiger von Sarkomen betroffen, was aufgrund der Malignität zu einem disproportional höheren Verlust an Lebensjahren führt. Der initialen Biopsie folgen häufig bereits molekulargenetische Untersuchungen wie z.B. die Bruchpunktanalyse, die spezifisch für einige Sarkome ist (Synovialsarkom, myxoides Liposarkom, Klarzellsarkom, etc.). Allerdings zeigen vielen Sarkome eine ausgeprägte Gewebheterogenität in sich, sodass sich bestimmte Mutationen nur in

einzelnen Anteilen des Tumors finden und durch eine Inzisions- oder Stanzbiopsie daher nicht immer erfasst werden können. Die Therapie ist für den jeweiligen histologischen Subtyp spezifisch und orientiert sich an prognostischen Faktoren wie dem Tumorstadium und Malignitätsgrad. Therapieentscheidungen, die auf Mutationen einzelner Onkogene beruhen, können daher durch eine konventionelle Biopsie nur insuffizient indiziert werden. Die Liquid Biopsy bietet hier potenziell die Möglichkeit, die gesamte Heterogenität eines Tumors abzubilden, und zwar sowohl im Rahmen der Diagnostik als auch im bereits metastasierten Stadium.

Bei lokalisierter Erkrankung ermöglicht die chirurgische Resektion zusammen mit einem multimodalen Konzept eine kurative Therapie. Dennoch kommt es bei etwa der Hälfte aller Patienten nach der Primärbehandlung zu einem Lokalrezidiv oder Fernmetastasen (3). Es muss daher angenommen werden, dass die aktuellen Möglichkeiten der präoperativen Staging-Diagnostik eine in vielen Fällen bereits vorliegende systemische Tumordisseminierung im Sinne einer minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) nicht erkennen können. Da sowohl die Resektion eines Lokalrezidivs als auch von Fernmetastasen das Langzeitüberleben verbessern können, wird nach erfolgter Primärbehandlung über viele Jahre eine klinische und radiologische Tumornachsorge durchgeführt (4, 5). Lokalrezidive werden gewöhnlich mittels MRT, Lungenmetastasen-Diagnostik mit konventionellen Röntgen-Thorax-Aufnahmen oder CT-Untersuchungen festgestellt. Da die Nachsorgeintervalle in den ersten Jahren nach der Primärbehandlung lediglich 3 Monate betragen, ist diese Diagnostik sehr aufwändig und kostenintensiv. So wurden in den USA 2004 mittlere Kosten von 6.401\$ pro Jahr für die Nachsorge von Sarkom-Patienten errechnet (6). Darüber hinaus werden aufgrund der anatomischen Begrenzung der Bildgebung auf das Operationsgebiet und die Lunge lediglich 75% der Rezidive -erkannt und es resultiert eine zusätzliche Strahlenbelastung von > 10 mSv/Jahr durch regelmäßige CT-Thorax-Untersuchungen (3). Dennoch erkennen bildgebende Verfahren Rezidive aufgrund des raschen Tumorwachstums häufig erst, wenn diese bereits klinisch erfassbar sind. Für die oft jungen, berufstätigen Patienten ist auch der große zeitliche Aufwand belastend, da eine Nachsorge in hoher Qualität in Anbetracht der Seltenheit der Erkrankung nur an weit entfernten, spezialisierten Zentren durchgeführt werden kann (7, 8). Es werden daher dringend neue Untersuchungsmethoden benötigt, die sowohl die Qualität als auch den Patientenkomfort der Tumornachsorge verbessern. Idealerweise sollte das diagnostische Verfahren zum einen Patienten mit MRD postoperativ identifizieren, zum anderen Patienten mit kleinen Lokalrezidiven, die in der Bildgebung noch nicht sichtbar sind, früher erkennen.

Diagnostik von Sarkomen

Die Diagnostik und Klassifikation von Sarkomen basiert klassischerweise auf histologischen und molekulargenetischen Untersuchungen des Tumorgewebes. Eine wiederholte Probengewinnung ist aufgrund der Invasivität der konventionell chirurgischen Gewebeentnahmen i.d.R. nicht möglich und kann bedingt durch die Heterogenität vieler Sarkomsubtypen diese zum Teil nicht erfassen und damit zu einer Verzögerung der Diagnose führen. Zudem existieren bisher keine Biomarker in der klinischen Routine zur Diagnostik und Tumornachsorge von Knochen- und Weichgewebssarkomen. Im Rahmen der Liquid Biopsy werden verschiedene Komponenten des Tumors, die durch Zellzerfall in die Blutzirkulation freigegeben werden, analysiert, wie z.B. tumorspezifische DNA (circulating tumor DNA; ctDNA), zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells; CTCs), zirkulierende RNA oder extrazelluläre Mikrovesikel (9). In der Literatur finden sich einige vielversprechende Ansätze, die differenziell exprimierte miRNAs im peripheren Blut von Sarkom-Patienten als potenziellen diagnostischen Bio-marker identifizierten (10, 11). So

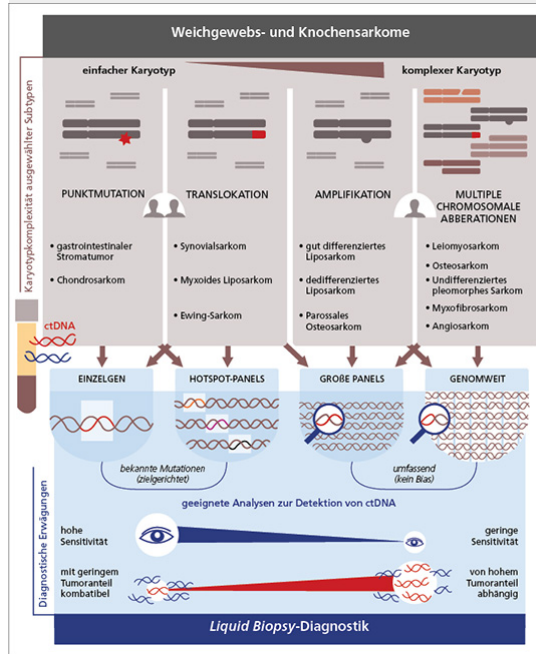
konnten Fricke et al. zeigen, dass Patienten mit Synovial-sarkomen anhand spezifischer miRNA-Marker-Profile im peripheren Blut von gesunden Kontrollen und Patienten in Remission unterschieden werden können (11). Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen indirekten Tumornachweis aufgrund tumorinduzierter Veränderungen im peripheren Blut.

Der Nachweis von CTCs ist bereits bei mehreren Sarkom-entitäten gelungen (12, 13). Aufgrund der Seltenheit von CTCs und der damit notwendigen hohen Blutvolumina eignet sich die Detektion von CTCs jedoch nur bedingt für diagnostische Zwecke. Auch der Nachweis zirkulierender, tumorspezifischer mRNA in Mikro-vesikeln bei Sarkom-Patienten scheint in Anbetracht der geringen Stabilität von mRNA für die Diagnostik problematisch (14).

DNA bietet im Gegensatz dazu aufgrund ihrer chemischen Stabilität sowohl für die Präanalytik als auch Analytik viele Vorteile und wird als Nachweisverfahren in der nicht-invasiven Tumordiagnostik in den letzten Jahren zunehmend favorisiert (15). Da Tumorzellen in ihrer Evolution verschiedene genetische Veränderung der DNA anhäufen, können sie anhand dieser von gesunden Zellen unterschieden werden. Durch Apoptose und Nekrose von Zellen gelangt freie, fragmentierte DNA in die periphere Zirkulation. Die Gesamtheit dieser DNA wird als freie, zirkulierende DNA (circulating free DNA; cfDNA) bezeichnet. Ein Bruchteil davon stammt aus Tumorzellen und besteht aus tumorspezifischer DNA (ctDNA), die mit modernen molekulargenetischen Verfahren nachgewiesen werden kann (15). Prinzipiell beinhaltet ctDNA das gesamte Tumorgenom und ermöglicht daher eine Abgrenzung zwischen verschiedenen Tumorentitäten trotz der gegebenen Heterogenität von Tumorgenomen (16-18). So konnte die Detektion von ctDNA mit klinischen Merkmalen von Malignomen wie dem Tumolvolumen und Stadium korreliert werden, was wiederum vermuten lässt, dass tumorspezifische DNA die biologische Tumorlast und Aktivität widerspiegelt (19). Hierdurch kann ein direkter, sensitiver Tumornachweis erfolgen, welcher als diagnostischer Bio-marker bei vielen epithelialen Tumoren den bildgebenden Verfahren bei der Erkennung einer MRD vermutlich überlegen ist (20, 21). Die Implementierung von ctDNA-Analysen kann daher sowohl MRD als auch das Ansprechen der onkologischen Therapie anzeigen (22, 23). So gelang es Tie et al. bei Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II durch das Vorhandensein von ctDNA nach vollständiger Tumoresektion das Auftreten eines Rezidivs bereits einige Monate vor dem radiologisch sichtbaren Tumorzidiv vorherzusagen (24). Dass ctDNA auch bei Sarkomen nachgewiesen werden kann und mit der Aktivität der Erkrankung korreliert, konnte erstmals bei Patienten mit Ewing-Sarkomen gezeigt werden (25). Bisher konnte nur bei wenigen Sarkom-entitäten ctDNA für diagnostische Zwecke analysiert werden. Die Komplexität und Diversität somatischer Veränderungen bei Sarkomen stellt eine Herausforderung für die Detektion von tumorspezifischer DNA im Blut dar und bedarf daher spezifischer und sensitiver Assays für jeden Subtyp (Abb. 1). Aufgrund dessen finden sich bisher nur wenige Studien zum Nachweis von ctDNA bei Knochen- oder Weichgewebssarkomen (26-29).

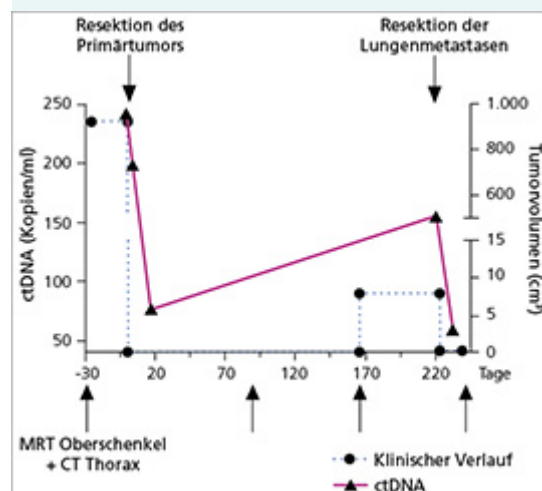
Abb. 1: Die Komplexität chromosomaler Mutationen bestimmt das notwendige Analyseverfahren für den Nachweis von ctDNA bei Sarkomen. Somatische Veränderungen können dabei in Form von einfachen Punktmutationen oder Translokationen vorliegen und bis zu

komplexen Genamplifikationen, Genfusionen oder strukturellen Rearrangements reichen. Die Wahl des optimalen Analyseverfahrens ist abhängig von der genetischen Komplexität, dem für Diagnostik oder Therapie notwendigen Grad an Sensitivität und der Menge an tumorassoziierter DNA im peripheren Blut (mod. nach (36)).



Kasuistik

Die Abbildung zeigt den Verlauf der tumorassoziierten DNA bei einem Patienten mit großem myxoiden Liposarkom des linken Oberschenkels. Die präoperativen Staging-Untersuchungen ergaben keinen Anhalt für eine Metastasierung und der Lokalbefund konnte vollständig reseziert werden. Die lokale Tumornachsorge erfolgte mittels MRT, die systemische mittels CT. Es ergab sich kein Anhalt für ein lokales Rezidiv des Tumors oder Metastasen in der Verlaufskontrolle 3 Monate postoperativ. Demgegenüber zeigte die Analyse der ctDNA eine minimale Resterkrankung nach R0-Resektion sowie einen sukzessiven Anstieg der ctDNA in der Kontrolle 3 Monate nach der Operation. Erst in der CT-Untersuchung 6 Monate postoperativ konnten mehrere kleinere Lungen-metastasen festgestellt werden, von denen alle bis auf eine chirurgisch entfernt werden konnten. Ein entsprechender Abfall in der ctDNA ist nach Metastasektomie festzustellen.



Trotz ihrer Diversität eignen sich die einzelnen Entitäten der Knochen- und Weichgewebssarkome aufgrund tumorspezifischer und charakteristischer Translokationen, Punktmutationen und

Genamplifikationen zum ctDNA-Nachweis. Mehrere Sarkomentitäten (myxo-ide Liposarkome, Synovialsarkome, Klarzellsarkome, Ewing-Sarkome, Derma-tofibrosarcoma pro-tuberans etc.), welche einen Anteil von ca. 25% der Sarkome ausmachen, besitzen charakteristische chromosomale Translokationen. Diese sind für die einzelnen Entitäten hochspezifisch (30). Die exakte Lokalisation der Bruchpunkte innerhalb der Introns variiert bei jedem Tumor minimal, sodass die Patienten anhand eines individuellen Bruchpunkts identifiziert werden können (31, 32). Hierdurch lassen sich hochsensitive sowie hochspezifische Nachweisverfahren für ctDNA bei Patienten mit translokationsassoziierten Weichgewebssarkomen entwickeln.

Sarkome, die nicht durch chromosomale Translokationen gekennzeichnet sind, besitzen z.T. tumortypische Punktmutationen. Durch eine stetig zunehmende Anzahl an Publikationen mit whole exome- und whole genome-Sequenzierungen unterschiedlicher Entitäten ist hier in den nächsten Jahren eine zunehmende Anzahl an Hotspot-Mutationen zu erwarten, welche für die Liquid Biopsy verwendet werden können. Des Weiteren findet man insbesondere bei Liposarkomen, der häufigsten Sarkomentität, charakteristische Genamplifikationen (MDM2, CDK4 u.a.), die tumorinduktiv und proliferativ wirken und für diagnostische Zwecke verwendet werden können. Ähnlich wie viele tumorspezifische Translokationen werden diese bereits in der pathologischen Routinediagnostik bestimmt.

Liquid Biopsy zur Tumornachsorge bei Liposarkomen

Bis dato kommen ctDNA-Analysen vorwiegend bei epithelialen Malignomen (z.B. Lungen-, Brust- und Kolonkarzinom) zum Einsatz und führen hier zu einer verbesserten und vereinfachten Tumordetektion und Therapiekontrolle (22). Neuere Arbeiten zeigen jedoch das Potenzial von Liquid Biopsy bei Weichgewebssarkomen auf. So konnten Braig et al. freie, zirkulierende DNA als diagnostischen Biomarker einsetzen und damit Blutproben von gesunden Probanden mit denen von Sarkom-Patienten mit aktivem Tumor sowie in Remission unterscheiden (33). Die Analyse der Fragmentierung und Quantifizierung von cfDNA kann dabei ohne Wissen des jeweiligen histologischen Subtyps oder spezifischer Tumormutationen erfolgen und mit einer Sensitivität und Spezifität von ca. 70-80% eine aktive Sarkom-erkrankung identifizieren. Dies stellt bei etwa 70 verschiedenen Weichgewebstumoren mit unterschiedlichsten genetischen Mutationen einen erheblichen Vorteil dar und ist hinsichtlich der Genauigkeit vergleichbar mit Untersuchungen bei epithelialen Malignomen (34). Da die fluorometrische Analyse von cfDNA keine spezifischen somatischen Veränderungen detektiert, ist dieses Verfahren anfällig für präanalytische Fehler. So können Training, Vorerkrankungen, chirurgische Eingriffe oder Traumata die Menge an cfDNA im Blut erhöhen und damit die Aussagekraft des Verfahrens einschränken (15). Auch die Handhabung und zügige Verarbeitung der Blutproben nach Entnahme ist entscheidend für die Validität des Testverfahrens. In Anbetracht der limitierten Sensitivität und Spezifität dieses Analyseverfahrens bei Sarkomen ist der weitflächige Einsatz im klinischen Alltag daher eher unwahrscheinlich.

Die Genotypisierung freier, zirkulierender DNA bietet den Vorteil, spezifische, tumorassoziierte genetische Mutationen im peripheren Blut nachzuweisen. Hierdurch werden die meisten Einschränkungen der zuvor genannten Methode umgangen und gleichzeitig eine höhere Sensitivität als bei radiologischen Nachweisverfahren erreicht (20). Braig et al. konnten mit diesem Ansatz zeigen, dass die Menge an ctDNA bei myxoiden Liposarkomen mit dem Tumolvolumen und -stadium korreliert (33). Sarkome mit wenigen, aber charakteristischen

chromosomalen Translokationen, Punktmutationen oder Genamplifikationen (z.B. Synovial-sarkome, Liposarkome oder Ewing-Sarkome) bieten somit einen idealen Ansatzpunkt für die Liquid Biopsy-Analyse mit einem bis dahin nicht dagewesenen Maß an Sensitivität und Spezifität. Da die Sensitivität des ctDNA-Nachweises auch von der Anzahl der chromosomalen Mutationen abhängt, kann die gleichzeitige Testung mehrerer tumorassoziierter Alterationen die Nachweisschwelle deutlich senken (21). Bei Sarkomen könnten damit möglicherweise Rezidive frühzeitig erkannt und selbst eine MRD nach vollständiger Resektion des Lokaltumors identifiziert werden (24, 33, 35). In Zukunft könnten Patienten mit der Möglichkeit und Weiterentwicklung des massive parallel sequencing damit eine nicht-invasive Diagnostik und Tumor-nachsorge mit beispielloser Sensitivität angeboten werden.

Die Aufnahme nicht-invasiver Nachweisverfahren zum diagnostischen Portfolio bietet Sarkom-Patienten eine individualisierte Therapie, die nicht ausschließlich auf pro- und retrospektiven Analysen mit geringen Fallzahlen basiert. So könnten Patienten mit nachweisbarer ctDNA nach R0-Resektion des Primärtumors, also mit MRD, eine adjuvante Systemtherapie angeboten und ctDNA-negativen Patienten die zusätzliche Toxizität erspart werden. In einem anderen Fall könnte auf einen plötzlichen Anstieg der tumorassozierten ctDNA eine intensivere radiologische Diagnostik erfolgen und bei unauffälligen ctDNA-Werten das radiologische Nachsorgeintervall verlängert und damit die Strahlenbelastung reduziert werden. Bei Sarkom-Patienten im metastasierten Stadium könnte die Liquid Biopsy durch den Nachweis von therapie-relevanten Mutationen entscheidende Hinweise für die Wahl und Steuerung der systemischen Therapie liefern. Gleichzeitig kann durch die Analyse von ctDNA das Ansprechen der Therapie kontrolliert werden (Progress bzw. Remission). Im Gegensatz zu bildgebenden Verfahren, die nur das Tumolvolumen erfassen, kann die Liquid Biopsy sowohl den Zerfall des Tumors unter systemischer Therapie als auch verbliebene Zellen nach Abschluss der Therapie identifizieren.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Genotypisierung von freier, zirkulierender DNA für spezifische, tumor-assoziierte chromosomale Aberrationen bietet ein enormes Potenzial für Diagnostik und Therapie bei Sarkomen. Durch die aktuellen Studien wurde der Grundstein für zentrumsübergreifende Untersuchungen gelegt, um zu klären, ob Liquid Biopsy bei Sarkomen die aktuellen Standardverfahren zur Diagnostik und Tumornachsorge sinnvoll ergänzen oder sogar teilweise ersetzen kann. Allerdings fehlen aktuell noch Studien mit ausreichend großer Fallzahl, um die Zuverlässigkeit der Liquid Biopsy im klinischen Alltag zu beurteilen. Die Weiterentwicklung und Automatisierung genetischer Analyseverfahren wie dem massive parallel sequencing wird die klinische Verfügbarkeit erhöhen und zudem den Anwendungsbereich auf Sarkome mit komplexen chromosomalen Mutationen erweitern. Die Integration dieser nicht-invasiven Analysen in den klinischen Alltag könnte somit nicht nur Sarkom-Patienten eine in diesem Ausmaß bisher nicht mögliche Individualisierung der Krebstherapie ermöglichen, sondern auch die Kosten für das Gesundheitssystem senken und letztlich das Langzeitüberleben erhöhen.

Es besteht kein Interessenkonflikt.

Zu diesem Artikel ist auch ein CME-Test verfügbar.

[Hier kommen Sie direkt zur Teilnahme](#)

(verfügbar bis zum 15.12.2021)

Um alle Fragen des CME-Tests beantworten zu können, lesen Sie dazu auch folgenden Artikel:

[Angiosarkome - eine heterogene vaskuläre Neoplasie mit variabler klinischer Präsentation](#)



Dr. med. Jurij Kiefer

Sektionsleiter plastisch-rekonstruktive Tumorchirurgie

Klinik für Plastische und Handchirurgie

Universitätsklinikum Freiburg

Medizinische Fakultät

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Hugstetter Straße 55

79106 Freiburg

Tel.: 0761/27024010

E-Mail: jurij.kiefer@uniklinik-freiburg.de

ABSTRACT

J. Kiefer, G. B. Stark, S. U. Eisenhardt, Klinik für Plastische und Handchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, D. Braig, Klinik für Hand-, Plastische und Ästhetische Chirurgie, Klinikum der Universität München, LMU München.

Bone and soft tissue sarcomas are rare malignant tumors of mesenchymal origin that arise mainly from connective and supportive tissue. About 50% of patients with sarcomas experience relapse of any type with more than 30% dying within 10 years after diagnosis. Diagnostic and therapeutic decisions increasingly rely on the molecular characteristics of the individual tumor. Sarcomas include a wide range of histological subtypes and show a vast diversity at the molecular level. Circulating tumor DNA (ctDNA) is released into peripheral blood and can be used for the genomic analysis of sarcomas by liquid biopsy. However, the heterogeneity and diversity of somatic changes observed in sarcomas are challenging when choosing an adequate assay for the detection of ctDNA in body fluids. Here, we provide an overview of the analytic potential of liquid biopsies in sarcomas, explicitly addressing the challenges that must be considered to achieve the sensitive detection of ctDNA and discuss the clinical applications in the management and treatment of sarcomas.

Keywords: *Bone and soft tissue sarcomas, molecular characteristics, ctDNA*