

Masterarbeit

Liquid Biopsy in der Früherkennung und Therapie
von Brustkrebs

eingereicht von

Viktoria Domanyi BSc

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

(MSc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Medizinischen Universität Graz

unter der Anleitung von Betreuerin

Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Ellen Heitzer

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 21.08.2023

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Ellen Heitzer, der Betreuerin meiner Masterarbeit, für die Zusammenarbeit sowie Unterstützung beim Verfassen und bei der Themenfindung bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meinen Studienkolleginnen, die mich bereits seit dem Bachelorstudium begleitet und unterstützt haben. Ein großer Dank gilt vor allem meiner Familie und meinen Freund*innen, die mir eine besonders große Stütze während meines gesamten Studiums waren.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
Zusammenfassung	VI
Abstract	VII
1. Einleitung	1
1.1 Entstehung von Krebs	2
1.1.1 Die Tumorzelle	3
1.1.2 Onkogene	4
1.1.3 Epigenetische Veränderungen und DNA Methylierung	6
1.1.4 Erbliche Tumorsyndrome	7
1.2 Brustkrebs	8
1.3 Krebsfrüherkennung	10
1.3.1 Mammographie	11
1.3.2 Biochemische Tumormarker zur Krebsfrüherkennung	12
1.4 Personalisierte Medizin	14
1.5 Liquid Biopsy	15
1.5.1 Cf DNA	17
1.5.2 Ct DNA	18
1.5.3 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)	19
1.5.4 Extrazelluläre Vesikel	21
1.5.5 Vorteile und Nachteile von Liquid Biopsy	22
1.5.6 Wo wird LB bereits genutzt?	23
2 Ziel der Arbeit	24
3 Resultate	25
3.1 Methoden der LB-basierten Krebsfrüherkennung	25
3.2 Herausforderungen der LB-basierten Früherkennung	28
3.3 Sensitivität und Spezifität LB-basierter Krebsfrüherkennungsmethoden	30
3.4 Kosten- Nutzenabschätzung von LB-basierten Krebsfrüherkennungsmethoden	37
4 Materialien und Methoden	38
5 Ausblick	39
6 Diskussion	41
6.1 Effektivität von Liquid Biopsy	41
6.2 Wann ist Liquid Biopsy sinnvoll	43
7 Literaturverzeichnis	45

8	Abbildungsverzeichnis.....	57
9	Tabellenverzeichnis.....	58

Abkürzungen

LB	Liquid Biopsy
ctDNA	zirkulierende Tumor-DNA
CTCs	zirkulierende Tumorzellen
EVs	Extrazelluläre Vesikel
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HR	Hormonrezeptor
CEA	Carcinoembryonic Antigen
DCIS	Duktales Carcinoma in Situ
bp	Basenpaare
DELFI	DNA evaluation of fragments for early interception
WGS	Whole Genome Sequencing

Zusammenfassung

Krebs entsteht durch krankhaftes Wachstum, welches das Resultat einer mutierten Zelle ist. Ungefähr bei der Hälfte der 2019 diagnostizierten Krebserkrankungen in Österreich waren Brust, Prostata, Darm oder Lunge betroffen. Der Zeitpunkt der Diagnose ist für den Therapieerfolg sowie die Prognose entscheidend. Aus diesem Grund wird laufend nicht nur an neuen Therapiemöglichkeiten, sondern auch an Früherkennungs- und Screeningmethoden für Tumorerkrankungen geforscht. Eine vielversprechende Methode stellt hierbei die sogenannte Flüssigbiopsie (engl. Liquid Biopsy, LB) dar. Als minimalinvasives Verfahren gilt sie im Gegensatz zur Gewebebiopsie als schonende und schnelle Alternative. Mit nur einer einzigen Blutabnahme soll der gesamte Tumor inklusive seiner Eigenschaften, noch bevor er seine Metastasen gebildet hat, analysiert werden können.

In dieser Arbeit wird zuerst ein Einblick in das Feld der Liquid Biopsy sowie ein Überblick über die Entstehung von Krebs gegeben und weiter speziell auf Brustkrebs eingegangen. Ziel dieser Arbeit ist es zu erörtern, ob sich die Liquid Biopsy als Früherkennungsmethode für Brustkrebs eignet und ob sie bereits die Fähigkeit besitzt herkömmliche, bildgebende Verfahren in der Früherkennung von Brustkrebs zu ersetzen. Um die formulierte Forschungsfrage zu beantworten, werden diverse Faktoren und Aspekte identifiziert und eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt. Die Resultate zeigen, dass die Liquid Biopsy vor allem ein vielversprechendes Tool zur Therapieüberwachung und Prognose von Tumorerkrankungen ist. In der Früherkennung ist sie ebenfalls für gewisse Tumorerkrankungen wie das kleinzellige Lungenkarzinom geeignet. In Bezug auf Brustkrebs erreichen die derzeit verfügbaren Methoden jedoch noch nicht die nötige Sensitivität und Spezifität, um in die Routine aufgenommen werden zu können. Vor allem die geringe Sensitivität bei geringer Tumorlast stellt derzeit noch eine Hürde dar, welche es zu überwinden gilt.

Abstract

Cancer is caused by pathological growth, which is the result of a mutated cell. Approximately half of the cancer cases diagnosed in Austria in 2019 affected the breast, prostate, intestine or lung. The time of diagnosis is decisive for the success of the therapy and the prognosis. For this reason, research is being conducted not only on therapy methods and medicines, but also on early detection and screening methods for tumor diseases. Liquid biopsy is a promising method in this context. As a minimally invasive procedure, it is considered a gentle and fast alternative to tissue biopsy. With just a single blood draw, it should be possible to analyse the entire tumour, along with its characteristics, even before it has formed its metastases.

This work provides an overview of the field of liquid biopsy and the development of cancer and will further specifically address breast cancer. The aim of this work is to discuss whether liquid biopsy is suitable as an early detection method for breast cancer and whether it already has the ability to replace conventional imaging techniques in the early detection of breast cancer. In order to answer the research question formulated, various factors and aspects are identified, and a comprehensive literature review is conducted.

The results have shown that liquid biopsy is above all a promising tool for monitoring therapy and prognosis of tumour diseases. In early detection, it is also suitable for certain tumour diseases such as small cell lung carcinoma. In relation to breast cancer, however, there is still a lot of research to be done before the method can be incorporated into routine practice. Above all, the low sensitivity with a low tumour burden is still a hurdle that needs to be overcome.

1. Einleitung

In Österreich leben ungefähr 375.749 von Krebs betroffene Personen, die Zahl der neu diagnostizierten Personen beträgt 41.775, jährlich gibt es 20.337 durch Tumorerkrankungen bedingte Sterbefälle. Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Bei etwa 50% der 2019 diagnostizierten Fälle waren Brust, Prostata, Darm oder Lunge betroffen. (1)

Durch die ansteigende Lebenserwartung unserer Generation steigt auch vermehrt das Krankheitsaufkommen, speziell auch jenes von Krebserkrankungen. Krebs hat weltweit hohe Auswirkungen auf die Gesellschaft und die Krebsforschung hat sich in den letzten Jahren stetig entwickelt und verbessert. Die Zahl der in Österreich jährlich an Krebs erkrankten Personen liegt momentan bei ungefähr bei 40.000 (Stand 2020). Dazu zählen alle malignen Neoplasien inklusive Leukämien und Lymphome. Diverse Hautkrebsformen sind hierbei nicht berücksichtigt mit Ausnahme des malignen Melanoms sowie diverser Carcinoma *in situ* Fälle.(2) Je nach Lokalisation, Ursache, Proliferation, Verfassung und Alter der Patient*innen unterscheiden sich die Prognose und der Verlauf von Tumorerkrankungen. Es gilt jedoch als allgemein bekannt, dass die Diagnose einer Tumorerkrankung in einem frühen Stadium eine weitaus bessere Prognose verspricht.(3) Tumore, die in frühen (lokalisierten) Stadien diagnostiziert werden, können meist erfolgreicher und schonender behandelt werden als jene in fortgeschrittene Stadien, in denen sich der Krebs schon auf andere Organe ausgebreitet hat. Daher ist im frühen Stadium oft ein kurativer Therapieansatz möglich, während fortgeschrittene Stadium zumeist nur palliativ behandelt werden. Bei einer Reihe von Krebsarten können neun von zehn erkrankten Personen geheilt werden, sofern die Krankheit so früh wie möglich erkannt wird. Obwohl es eine Reihe von kostenlosen Krebsfrüherkennungsoptionen, wie Mammographie oder Koloskopie, gibt, nutzt nur jede zweite Frau über 20 und jeder fünfte Mann über 45 dieses Angebot. Die Entwicklung eines nicht-invasiven Pan-Cancer-Screening-Tests – der also nicht nur auf eine einzige Entität abzielt - der sowohl kostengünstig als auch schnell und effizient ist, ist daher eines der größten Ziele in der Erforschung und Bekämpfung

von Krebserkrankungen. Durch das Einführen einer solchen Methode verspricht man sich eine maximale Verringerung der Krebsmortalität sowie der Morbidität. (3)

1.1 Entstehung von Krebs

Krebs wird definiert als ein unkontrolliertes Zellwachstum, wobei die Krebszellen aus einer einzigen mutierten Zelle hervorgehen. Für eine Entartung und der Entstehung eines malignen Tumors sind jedoch 2 bis 8 Mutationen in sogenannten Krebsgenen notwendig.(4) Generell entsteht Krebs durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren, diese können exogen oder endogen sein. Endogene Faktoren wären beispielsweise genetische Determination. Einer der bekanntesten exogenen Faktoren ist das Rauchen. Endogene Faktoren sind durch Abläufe im Körper bedingt. Bei Krebs handelt es sich um autonomes, unkontrolliertes Wachstum, welches nicht mit herkömmlichem Zellwachstum zu vergleichen ist. Er umgeht die natürlichen Wachstumskontrollen des Körpers so lange bis ein Tumor entstanden ist. Maligne Tumorerkrankungen sind schnell fortschreitend, oft metastasierend, sind invasiv, und sind nicht abgekapselt.(5) Tumorzellen infiltrieren umliegendes gesundes Gewebe und verdrängen bzw. vernichten es. Weiters werden eine häufige Zellteilung und eine schlechte Differenzierung beobachtet. Etwa 10% der Krebserkrankungen sind hereditär, die restlichen Krebserkrankungen entstehen im Laufe unseres Lebens durch unterschiedliche Faktoren, diese können inneren oder auch äußeren Ursprungs sein. Äußere Faktoren wären beispielsweise Ernährung oder jegliche Arten von Noxen.(6)

Jeder Tumor ist einzigartig in seinen Eigenschaften. Tumorentstehung ist in jedem Gewebe des Körpers möglich, jedoch entstehen in Geweben mit erhöhter Zellteilungsaktivität weitaus häufiger Tumore als in Geweben, in denen weniger Aktivität herrscht. Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen verleihen Krebszellen die Fähigkeit, ihre Nachbarzellen *in situ* zu überwachsen. Um den Bedingungen in soliden Tumoren standzuhalten und so zu überleben, müssen Krebszellen auch die Nutzung von Nährstoffen umstrukturieren, wenn benötigte Ressourcen, wie beispielsweise Glukose, knapp werden, und sich aus anderen

Quellen der Nährstoffe bedienen. Sie sind also metabolisch hoch anpassungsfähig.(7)

Die metabolische Unterschiedlichkeit innerhalb von Tumoren stellt eine bedeutende Herausforderung im Bereich des Krebsstoffwechsels dar. Während bereits bekannt ist, dass sowohl treibende Mutationen als auch das Ursprungsgewebe den Stoffwechsel beeinflussen, gibt es vergleichsweise wenig Wissen über Heterogenität innerhalb einzelner Tumore. Regionale Unterschiede in der Nährstoffversorgung, lokale Auswirkungen von Stromazellen, Entzündungsreaktionen und zelluläre Effekte können die metabolischen Bedürfnisse sowie die Flexibilität verändern. Die Stoffwechsellumgebung wird zusätzlich durch Effekte beeinflusst, beispielsweise kann von Krebszellen ausgeschiedenes Laktat die Mikroumgebung versauern und eine entzündliche Reaktion auslösen, die wiederum das Tumorwachstum fördert. Es ist ebenso bereits bekannt, dass genetische Heterogenität eine Rolle bei Metastasenbildung und klinischer Resistenz spielt.(8)

1.1.1 Die Tumorzelle

Der Ausgangspunkt von Krebs und somit auch der Karzinogenese ist eine mutierte Vorläuferzelle. Diese entsteht durch komplexe Mutationen innerhalb des Genoms. Diese Stammzelle ist aus verschiedenen Gründen genetisch verändert und weist andere Eigenschaften als die gesunden Zellen auf. Die Veränderungen können bedingt sein durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen bzw. Onkogenen oder physikalische Noxen. Bei einer gesunden Zelle geschehen das Wachstum die Teilung und die Apoptose kontrolliert. Diese Funktionen sind zwingend notwendig, um den physiologischen Ablauf im Gleichgewicht zu halten. Krebszellen jedoch haben genau gegenteilige Eigenschaften. Sie wachsen ohne jegliche Regulation, haben also eine stark erhöhte Proliferationsrate und gehen nicht in den kontrollierten Zelltod, die Apoptose. Sie sind meist unausgereift und metastasieren in anderes Gewebe über Lymph- oder Blutbahn. Die Ansammlung solcher Tumorzellen nennt man einen Tumor. Die mutierte Tumorzelle beginnt zu wachsen,

wird in weiterer Folge invasiv und bildet schließlich ein eigenes Durchblutungssystem aus.(9)

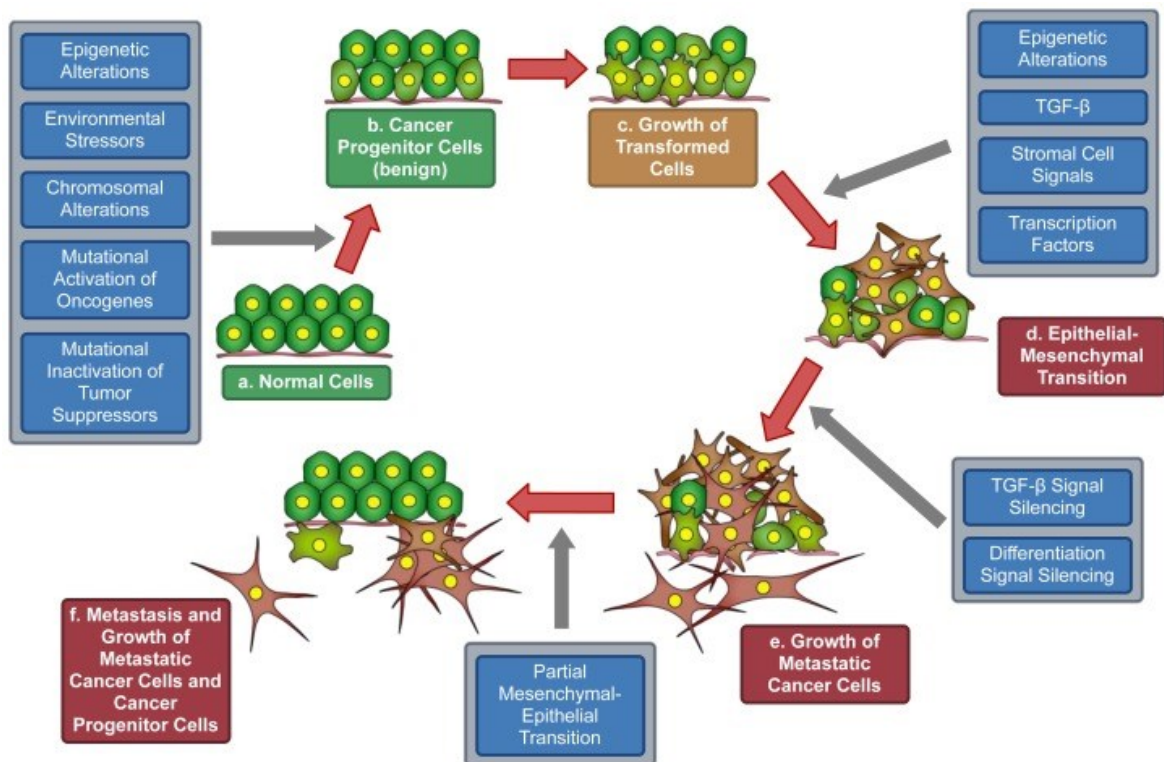


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Karzinogenese (Quelle: Sarkar et al. *Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview*. doi: 10.3390/ijms141021087). Die Darstellung zeigt genetische wie epigenetische Alterationen, die zu in die Karzinogenese bis hin zu metastasierendem Krebs, involviert sind

Krebsvorläuferzellen entwickeln sich aus normalen Zellen und durchlaufen eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), bevor sie sich zu metastatischen Krebszellen entwickeln. Diese metastatischen Zellen überwuchern den Ursprungsort und können später an einen entfernten Ort wandern, dies wird in Abbildung 1 dargestellt.

1.1.2 Onkogene

Das humane Genom besteht aus rund 20.000 Genen, wobei nur ein kleiner Teil davon mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist.(10) Der Cancer Gene Census (CGC) ist ein fortlaufender Versuch, die Gene zu katalogisieren, die Mutationen enthalten, die kausal mit Krebs in Verbindung gebracht werden, und zu erklären, wie eine Fehlfunktion dieser Gene Krebs verursacht (11). Zurzeit sind mehr als 700

Krebs-assoziierte Gene bekannt. Prinzipiell werden Krebsgene in drei Gruppen eingeteilt, Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Reparaturgene.

Proto-Onkogene sind Gene, die der Zelle bei der Selbstregulierung helfen. Verändert sich ein Proto-Onkogen durch beispielsweise eine Mutation, wird es unkontrolliert aktiviert und wird zum Onkogen. (12) Das Onkogen verursacht nun unkontrolliertes Wachstum innerhalb der Zelle, was schließlich meist zu einem Tumor führt. Bislang sind mehr als 40 Proto-Onkogene beim Menschen bekannt. Onkogene entstehen als Folge von Mutationen, die den Expressionsgrad oder die Aktivität eines Proto-Onkogens erhöhen. Es gibt mehrere Möglichkeiten die zu der Entstehung eines Onkogenes führen:

- Mutationen (Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen), die zu einem überaktiven Genprodukt führen.
- Mutationen (Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen), im Promotorbereich eines Proto-Onkogens, die zu einer erhöhten Transkription führen.
- Genamplifikationen, die zu zusätzlichen extrachromosomalen Kopien eines Proto-Onkogens führen.
- Chromosomale Translokationen, bei denen ein Proto-Onkogen an einen neuen chromosomalen Ort verlagert wird, was zu einer höheren Expression führt.
- Translokationen (chromosomal), die zu einer Fusion zwischen einem Proto-Onkogen und einem zweiten Gen führen, wodurch ein Fusionsprotein mit onkogener Aktivität entsteht.(13)

Im Gegensatz zu Onkogenen, müssen Tumorsuppressoren inaktiviert werden, um zur Karzinogenese beizutragen. Dafür müssen beide Genkopien betroffen sein, um den Verlust der Funktion des Gens zu gewährleisten und dem Tumorwachstum zu nützen. (12) Ein klassisches Beispiel für die Rolle von Tumorsuppressorgenen in der Entstehung von Brustkrebs wären *BRCA1* und *BRCA2*. Sie sind zwei eigenständige Tumorsuppressorgene, die sehr wichtig für Reparaturen von DNA-Brüchen sind. Keimbahnmutationen des *BRCA1*-Gens prädisponieren Individuen hauptsächlich für Brust- und Eierstockkrebs, sie erhöhen aber auch das Risiko für Eileiter- und in geringerem Maße für Bauchspeicheldrüsen- und Prostatakrebs. Es

wird vermutet, dass das Genprodukt in gewebespezifische Prozesse in diesen Organen, insbesondere in der Brust und im Eierstock, involviert ist. Also stehen die regulatorischen Funktionen der *BRCA1/2*-Gene zur Überwachung von DNA-Reparaturmechanismen sowie von Zellzyklus-Kontrollpunkten eng mit ihren Tumorsuppressor-Aktivitäten Verbindung.(14)

1.1.3 Epigenetische Veränderungen und DNA Methylierung

Epigenetische Ereignisse wie die DNA-Methylierung, spielen eine entscheidende Rolle in der Unterdrückung und Exprimierung von Genen und somit in der Entstehung und Entwicklung von Krebs.(15) DNA-Methylierung ist eine epigenetische Modifikation, bei der Methylgruppen an die DNA-Moleküle gebunden werden. Diese Modifikation kann die Genexpression beeinflussen, ohne die zugrunde liegende DNA-Sequenz zu verändern.(16) Der Fehlerhafte Ablauf der DNA-Methylierung kann dazu führen, dass Tumorsuppressorgene stummgeschaltet werden und somit Zellzyklen, DNA-Reparatur und Chromosomenstabilität beeinflusst sind.(17) Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe an das Cytosin an Position 5 der DNA-Basenpaare gebunden, typischerweise in der sogenannten CpG-Dinukleotid-Sequenz. Diese Methylierung kann dazu führen, dass die umliegenden Gene abgeschaltet oder ihre Aktivität reguliert wird. Dies kann während der Entwicklung, der Differenzierung von Zellen und in Reaktion auf Umweltfaktoren auftreten.(16,18)

Die DNA-Methylierung spielt eine entscheidende Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen, darunter:

- **Genregulation:** DNA-Methylierung kann die Genexpression beeinflussen, indem sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen an die DNA behindert. Dies kann dazu führen, dass bestimmte Gene inaktiviert werden.
- **Genomische Stabilität:** DNA-Methylierung kann dazu beitragen, die Stabilität des Genoms aufrechtzuerhalten, indem sie repetitive DNA-Sequenzen und mobile genetische Elemente unterdrückt.(18,19)

- **Entwicklung und Differenzierung:** Während der embryonalen Entwicklung und der Differenzierung von Zellen werden spezifische Muster der DNA-Methylierung etabliert, die die Identität und Funktion verschiedener Zelltypen festlegen.(20)
- **Krankheiten:** Störungen in der DNA-Methylierung sind mit verschiedenen Krankheiten verbunden, darunter Krebs, neurologische Erkrankungen und Stoffwechselerkrankungen. Abnorme DNA-Methylierung ist ein frühes Ereignis in der Krebsentwicklung und kann in cfDNA nachgewiesen werden, was einen wertvollen Krebs-Biomarker darstellt.(15)

1.1.4 Erbliche Tumorsyndrome

Ungefähr 5% bis 10% aller malignen Tumorerkrankungen sind durch eine Tumorprädisposition verursacht.(21,22) In der überwiegenden Mehrheit der erblichen Tumorsyndrome sind Tumorsuppressorgene betroffen. Durch eine Keimbahnmutation in einem Tumorsuppressorgen kommt es zu einem ein stark erhöhtes Risiko an einem Tumor zu erkranken, da jede Körperzelle von der Mutation betroffen ist. Für eine tatsächliche Tumorentstehung muss jedoch aufgrund der rezessiven Wirkung der Tumorsuppressorgene die zweite Genkopie durch eine somatische Mutation inaktiviert werden.(6,23)

Anzeichen für ein erbliches Tumorsyndrom bei Patient*innen können beispielsweise ein frühes Erkrankungsalter oder das Auftreten mehrerer Tumoren bei einem/einer Patient*in sein. Die häufigsten erblichen Tumorerkrankungen sind das erbliche Brust- und Eierstockkrebs-Syndrom sowie erblich bedingter Darmkrebs. Um die Chancen auf Heilung so gut wie möglich zu gewährleisten, gibt es verschiedene Vorgehensweisen welche bei Patient*innen mit erblichen Tumorsyndromen angewandt werden. Besteht der Verdacht auf eine hereditäre Tumorerkrankung so wird der/die Patient*in meist im Rahmen einer humangenetischen Untersuchung analysiert. Im Falle von Brustkrebs besteht der regelmäßige Bedarf einer Mammographie sowie regelmäßigen gynäkologischen Untersuchungen und engmaschigen Screenings von Tumormarkern. Bei Hochrisiko-Patient*innen

besteht weiters die Möglichkeit einer Mastektomie. (24–26) Gerade bei betroffenen Personen wäre ein LB-basiertes Screening sehr wichtig. Die Tatsache, dass sie an einer Prädisposition leiden aber noch nicht erkrankt sind bietet eine Grundlage für diese Art von Untersuchung. Mit passenden Biomarkern, sowie hoher Sensitivität und Spezifität könnte das die Früherkennung von Krebs revolutionieren.

1.2 Brustkrebs

Im Dezember 2020 gab die Weltgesundheitsorganisation (WHO) bekannt, dass der Brustkrebs den Lungenkrebs als die weltweit am häufigsten diagnostizierte und vorkommende Krebsart abgelöst hat.(27)

Unter Brustkrebs versteht man einen malignen Tumor im Bereich der Brust, der von Zellen der Brustdrüse ausgeht. Brustkrebs ist weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen und auch die Hauptursache für krebsbedingte Todesfälle. Im Jahr 2008 wurden etwa 1,38 Millionen neue Brustkrebsfälle diagnostiziert. Es gibt erhebliche Unterschiede in den Überlebensraten bei Brustkrebs weltweit, mit einer geschätzten 5-Jahres-Überlebensrate von 80% in entwickelten Ländern und weniger als 40% in Entwicklungsländern. (27) Wie alle Krebserkrankungen, ist Brustkrebs eine genetische Erkrankung. Genetische Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen verwandeln Brustepithelzellen in eine maligne Form und beeinflussen das Verhalten des Tumors, einschließlich der Reaktion auf die Therapie und des klinischen Ergebnisses.(28)

Molekulare Tests helfen dabei, bestimmte Gene als Biomarker zu identifizieren, die zur Vorhersage der Prognose der Krankheit und der Wirksamkeit der Behandlung beitragen können. Die Behandlungsmöglichkeiten von Patient*innen, die von Brustkrebs betroffen sind, umfassen Strahlentherapien, Operationen, Chemotherapien, sowie endokrine Therapien. Eine weitere, jüngere, vielversprechende Behandlungsmethode sind t die sog. zielgerichtete Therapien (engl., Targeted Therapy). Die Entscheidung darüber, welche Therapie angewandt wird, hängt vom Subtyp des Brustkrebses sowie vom Stadium bei der Diagnose ab.

Brustkrebs gilt als eine äußerst komplexe Erkrankung und wird in verschiedene Subtypen eingeteilt. Diese Subtypen haben eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung personalisierter Therapiestrategien. Die Einteilung in besagte Subtypen basiert auf vorhandenen Oberflächenrezeptoren. Generell unterscheidet man zwischen den Folgenden:

- Hormonrezeptor (HR)-positiv/ Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2)-negativ (~69%)
- HR-negativ/HER2-negativ (~10%)
- HR-positiv/HER2-positiv (~ 10%)
- HR-negativ/HER2-positiv (~ 4%)

Die Unterscheidungen sind ausschlaggebend für die Behandlungsmöglichkeiten aber auch für das Wachstumsverhalten der Tumore. HR steht für den Hormonrezeptor. Unter HR+ versteht man, dass Tumorzellen Rezeptoren für die Hormone Progesteron oder Estradiol haben, die das Wachstum von HR+ Tumoren fördern können. HER2 steht für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2. HER2+ bedeutet, dass Tumorzellen hohe Mengen an einem Protein namens HER2 produzieren, das wiederum mit bestimmten aggressiven Brustkrebsarten in Verbindung gebracht wird. Der Subtyp HR+/HER2- ist der häufigste mit einer Rate von 87,2 neuen Fällen pro 100.000 Frauen, basierend auf Fällen von 2016 bis 2020.(29)

Für die Therapieauswahl wird zudem auch der Proliferationsmarker Marker Ki-67, der Aufschluss darüber gibt, wie schnell der Tumor wächst, herangezogen.(30,31) Wenn 25% oder mehr Zellen, eine Ki-67 Positivität aufweisen, geht man von einem hohen Risiko aus, und würde aggressiver behandeln als bei Tumoren die nur wenige Ki-67-positive Zellen aufweisen. Unter Berücksichtigung von Ki-67 hat sich eine weitere Unterteilung in molekulare Subtypen etabliert, die mit unterschiedlichen Prognosen sowie Therapiekonzepten verbunden ist. Dabei werden HR+ Tumore in Abhängigkeit ihrer Ki-67 Status in Luminal A (HR-positiv, HER2-negativ, Ki-67 niedrig) und Luminal B (HR-positiv, HER2-negativ, Ki-67 hoch) Tumore unterteilt.

Im Allgemeinen hängt die Behandlung von Brustkrebs von unterschiedlichen Faktoren ab, darunter das Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose sowie der Subtyp

des Tumors, die individuellen Merkmale der Patient*innen. Zu den klassischen diagnostischen/überwachenden Verfahren gehören bildgebende Verfahren (Mammographie, Ultraschall, MRT, CT, PET und Röntgen) sowie die Gewebebiopsie.(32) aktuell neuere Ansätze sind die Hormontherapie und zielgerichtete Therapien (sog. Targeted Therapies). Hormontherapien werden oft bei Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs eingesetzt, um das Wachstum von Tumorzellen zu blockieren. Zielgerichtete Therapien richten sich spezifisch an Moleküle, die für das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors verantwortlich sind, wie zum Beispiel HER2-Hemmer bei HER2-positivem Brustkrebs.(33)

1.3 Krebsfrüherkennung

Derzeit stehen nur bei einigen wenigen Arten von Krebs wirksame Screening-Methoden zur Verfügung, die jedoch oft komplizierte Verfahren und unbefriedigende Leistung aufweisen. Daher besteht ein dringender Bedarf nach einfachen, genauen und nicht-invasiven Methoden zur Früherkennung von Krebs.(34) Prinzipiell unterscheidet man zwischen zwei Ansätzen beim Krebscreening: die Vorbeugung von Krankheiten durch das Auffinden und Entfernen von prämaligen Läsionen sowie die Früherkennung von Krebs, bei der das Ziel darin besteht, den invasiven Tumor so früh wie möglich zu diagnostizieren, um dadurch die Heilungschancen sowie den Therapieerfolg zu maximieren.(35)

Ziel der Krebsfrüherkennung ist es eine meist tödliche Krankheit bereits dann zu erkennen, wenn die Chancen auf Heilung und die Steigerung der Lebenserwartung und der Lebensqualität noch sehr gut sind. Mit höherem Lebensalter steigt auch das Risiko an Krebs zu erkranken an. Von der American Cancer Society werden jährlich Daten über Krebserkrankungen in den USA gesammelt. Durch diese Daten werden von der American Cancer Society die Anzahl neuer Krebsfälle sowie die Anzahl der durch Krebs verursachten Todesfälle prognostiziert. Für das Jahr 2023 werden laut dieser Organisation 1.958.310 neue Krebsfälle und 609.820 Krebstodesfälle erwartet. Aus diesen Daten geht zum Beispiel hervor, dass in den letzten Jahren die Inzidenz von Prostatakrebs bei Männern gestiegen ist. Weiters wurde dadurch erhoben, dass bei Frauen der Rückgang von Lungenkrebs langsamer voranging als bei Männern, während Brust-, Gebärmutterkörper-, Leber- und

Melanomkrebsdiagnosen zunehmen. Aus diesen Zahlen geht hervor, dass weltweit jährlich durch das Vorkommen dieser Erkrankungen ein System notwendig ist, um möglichst viele Erkrankungen so früh wie möglich zu erkennen, um eine echte Therapie- und Heilungschance zu haben.

1.3.1 Mammographie

In Österreich ist es Frauen seit 2014 möglich, freiwillig eine Brustkrebsfrüherkennungs-Untersuchung in Form einer Mammografie durchzuführen. Dazu bedarf es keiner Überweisung, somit bleibt es Frau selbst überlassen darüber zu entscheiden. Frauen zwischen dem 45 und 69 Lebensjahr erhalten alle zwei Jahre eine postalische Einladung.(36) Die Mammografie als Screeningmethode von Brustkrebs ist also darauf ausgelegt die maligne Erkrankung so früh wie möglich zu diagnostizieren. Um einen Vorteil durch die Erkennung mittels Mammografie zu haben, sollte der Tumor noch nicht metastasiert sein sowie ein lineares Wachstum vorweisen. Sind diese Bedingungen nicht gegeben, so ist die Mammografie mit höchster Wahrscheinlichkeit nicht die geeignete Methode für diese Form der Früherkennung.(37)

Die Mammographie wurde im Gegensatz zu anderen Krebsvorsorgeuntersuchungen vor ihrer weitreichenden Empfehlung und Umsetzung in randomisierten Studien evaluiert. Dennoch gab es seit dem Jahr 2000 eine kontinuierliche Diskussion über diese Screeningmethode. Diese wurde durch eine Cochrane-Übersichtsanalyse der randomisierten Studien ausgelöst und wies darauf hin, dass das Screening nur eine geringe Wirkung hat. Aktuell wird über die Wirkung des Mammographie-Screenings außerhalb des experimentellen Rahmens diskutiert, insbesondere im moderneren Zeitalter mit Verbesserungen in Aufklärung, Diagnostik und Behandlung.(38)

Die Mammographie-Debatte befasst sich nicht nur mit den Vorteilen, sondern auch mit den für die Patient*innen verursachten Schäden der Screeningmethode. In den letzten 10 Jahren hat sich das Bewusstsein für sogenannte Überdiagnosen die aus einer Mammographie hervorgehen können erhöht. In diesem Fall versteht man unter einer Überdiagnose, dass Tumore entdeckt werden, die ohne das Screening

bei Patient*innen niemals zu einer Symptomatik oder einer lebensbedrohlichen Situation geführt hätten. Dies stellt einen direkten Schaden für die Betroffenen dar, da es keine zuverlässigen Marker gibt, um überdiagnostizierte Tumore von malignen Tumoren zu unterscheiden. Aus diesem Grund werden alle durch das Verfahren erkannte Tumore behandelt, was bei den betroffenen Patient*innen zu Schäden in Form von Nebenwirkungen führt, jedoch ohne ihnen einen Nutzen zu bringen.(39) Basierend auf randomisierten Brustkrebs-Screening Studien liegt die geschätzte relative Reduktion der Brustkrebssterblichkeit bei Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren zwischen 15% und 25%. Die Unterschiede in den Schätzungen ergeben sich aus den verschiedenen in die zusammengefassten Ergebnisse einbezogenen Studien. Während bei der 25%igen Reduktion das Mammographie-Screening mit keiner Untersuchung verglichen wurde, wurde bei der 15%igen Reduktion eine methodische Anpassung für bestimmte Studien vorgenommen.(40) Eine Mammographie kann zu sowohl falsch-positiven als auch falsch-negativen Ergebnissen führen, Belastung durch Strahlenexposition auslösen und einen mehrfachen, aufwändigen und für Patient*innen herausfordernden Einsatz von Biopsien erfordern. Außerdem kann sie potenzielle spontane Veränderungen der Tumoreigenschaften nicht schnell genug erkennen.(41)

1.3.2 Biochemische Tumormarker zur Krebsfrüherkennung

Das Vorkommen von Tumormarkern sowie ihrer Menge im Blut von Patient*innen sind Merkmale für die Entstehung und dem Wachstum von Tumoren. Je nach Art des Tumors gibt es spezifische Marker zur Diagnosestellung beziehungsweise zur Therapieüberwachung. Tumormarker in der klinischen Diagnostik umfassen diverse Moleküle die von neoplastischen Zellen synthetisiert werden. Diese Marker können endogene Produkte metabolischen bösartigen Zellen sein. Sie können aber auch Produkte neuer Gene sowie durch den Tumor neu entstandene Antigene sein. Ein idealer Tumormarker sollte hoch sensitiv, spezifisch, zuverlässig, mit hoher prognostischer Wertigkeit und organspezifisch sein sowie mit den Tumorstadien korrelieren. Allerdings erfüllen bisherige Tumormarker nicht alle diese Eigenschaften. Trotz dieser Einschränkungen haben viele Tumormarker sich als prognostische und diagnostische Marker bewiesen und etabliert. Darüber hinaus

hilft die Bestimmung von Tumormarkern auch bei der Früherkennung von Krebsrezidiven.(42)

In der Brustkrebsdiagnostik werden diverse Tumormarker herangezogen, um Tumore zu erkennen und zu prognostizieren. CA15-3 und CA27-29 sind kohlenhydrathaltige Proteinantigene des Transmembran-Glykoproteins MUC-1, das anscheinend die Lyse von Tumorzellen hemmt und die Zell-Zell-Interaktion reduziert. Bei primärem Brustkrebs haben mehrere Studien gezeigt, dass erhöhte CEA-Werte bei der Diagnose eine ungünstige Prognose bedeuten. CEA (Carcinoembryonic Antigen) ist ein Glykoprotein, das an der Zelladhäsion beteiligt ist und in zahlreichen Krebserkrankungen erhöht sein kann. Ebenso haben verschiedene Studien gezeigt, dass erhöhte Serum-CA15-3-Werte bei der Diagnose mit einem höheren Brustkrebsstadium, einer größeren Tumorgroße, positiven axillären Lymphknoten sowie einer schlechteren Gesamtüberlebensrate (OS) und krankheitsfreien Überlebensrate (DFS) assoziiert sind.(43)

CA15-3 und CEA sind Serummarker, die häufig in der klinischen Routinediagnostik zur Überwachung der Therapieantwort bei Patient*innen mit metastasierendem Brustkrebs kontrolliert werden. Die Sensitivitätswerte von CA15.3 und CEA liegen bei etwa 70% bzw. 50% zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs. Diese Tumormarker korrelieren auch mit der Tumormasse. Es gibt jedoch diverse Einschränkungen bei der Verwendung von CA15.3 und CEA in der Nachsorge bei metastasiertem Brustkrebs, da diese Serummarker eine geringe Spezifität und widersprüchliche Ergebnisse in Studien aufweisen. Schließlich empfiehlt das National Comprehensive Cancer Network (NCCN), dass isoliert ansteigende Tumormarker nicht zur Definition von Krankheitsprogression verwendet werden sollten und bei Patient*innen mit knochendominanter Metastasierung in Verbindung mit Patient*innen-Symptomen (Kategorie 2A) berücksichtigt werden sollten.(44)

1.4 Personalisierte Medizin

Die Präzisionsonkologie strebt an, molekulare Informationen über Krebs zu nutzen, um die Therapieergebnisse der Patient*innen zu verbessern. Während Gewebeproben bisher oft zur Charakterisierung verschiedener Tumoren verwendet wurden, stoßen sie auf Einschränkungen hinsichtlich Probenentnahme sowie der Repräsentation des gesamten Tumolvolumens. Aus diesem Grund gewinnen minimalinvasive LBs an Bedeutung, da sie die Analyse von Tumorkomponenten in Körperflüssigkeiten wie Blut, Harn etc. ermöglichen. Studien zeigen, dass Liquid Biopsies die evolutionäre Dynamik und Heterogenität von Tumoren verfolgen können und frühzeitig Therapieresistenz, Restkrankheit und Rückfälle erkennen können. (45) Dennoch müssen die analytische Gültigkeit und klinische Nützlichkeit von LB umfassend nachgewiesen werden, bevor sie als Standardmethode etabliert werden kann.

Wie bereits in Kapitel 1.1 Entstehung von Krebs erwähnt, entwickelt sich eine Zelle mit normalem Erbgut zu einer Krebszelle durch Mutationen. Einige dieser Mutationen entstehen sporadisch, wohingegen andere in Form von Krebsprädispositionsgenen vererbt werden. Durch die Identifizierung von Krebsprädispositionsgenen entstanden Screening-Programme, um Patient*innen zu identifizieren, die ein erhöhtes Krebsrisiko haben.(46) Unter Präzisionsmedizin, auch personalisierte Medizin, versteht man die Auswahl zielgerichteter Therapien basierend auf einem verbesserten Verständnis der individuellen genetischen Grundlagen von Krankheiten. Jede*r Patient*in und jeder Tumor ist einzigartig, daher ist der Gedanke nicht unlogisch auch einen Therapieansatz individuell zu gestalten um die bestmögliche Prognose sowie Heilungschance gewährleisten zu können. Da der Markt und die Möglichkeiten für die Sequenzierung von Tumorgenomen stetig wachsen, wirkt eine genomgesteuerte Onkologie realistisch.(47) Die Präzisionsmedizin umfasst die Analyse von klinisch-pathologischen Faktoren sowie "Omics"-Analysen (Genomik, Transkriptomik, Metabolomik und Proteomik).(48)

Trastuzumab war beispielsweise der erste zugelassene Antikörper für den Einsatz personalisierter Medizin gegen Brustkrebs (. Es handelt sich hierbei um einen

humanisierten monoklonalen IgG1-Antikörper. Dieser kommt zum Einsatz bei Brustkrebspatient*innen, deren Tumore das Onkogen HER2 überexprimieren. Obwohl ein HER2-positiver Status ursprünglich mit einer schlechten Prognose verbunden war, ist dies aber auch ein starker prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf Trastuzumab. Eine systematische Übersichtsarbeit von Cochrane über acht randomisierte kontrollierte Studien mit insgesamt 11.991 Patient*innen zeigte, dass die Sterblichkeit durch Brustkrebs um ein Drittel reduziert wurde, wenn Trastuzumab länger als 6 Monate zu den Standard-Chemotherapie-Regimen für Patient*innen mit HER2-Überexpression hinzugefügt wurde. Die Rate an rezidiertem Brustkrebs wurde in dieser Kohorte um 40% reduziert.(49) Seit der Zulassung von Trastuzumab 1998 wurden diverse weitere Medikamente, die auf HER2 abzielen, getestet und an deren Entwicklung gearbeitet.(50) Die Bindung von Trastuzumab an den HER2 Rezeptor führt zur Herunterregulierung des Gleichen. Dadurch wird die Proliferation in HER2-überexprimierenden Tumorzellen unterdrückt und sie sterben.(51)

1.5 Liquid Biopsy

Im Gegensatz zur herkömmlichen Gewebebiopsie ist die Liquid Biopsy ein minimal-invasives, molekulargenetisches Verfahren, welches eine vielversprechende Option darstellt, verschiedenste diagnostisch relevante, tumorabhängige Marker in Körperflüssigkeiten mit lediglich einer einfachen Blutprobe zu erlangen. Dieses Verfahren macht beispielsweise die Identifizierung neuer Zielstrukturen sowie die Vorhersage von Behandlungsreaktionen möglich. Es können für das Verfahren diverse Körperflüssigkeiten verwendet werden, wobei die überwiegende Evidenz im Bereich der Tumordiagnostik von Liquid Biopsy Anwendungen aus Blutproben stammt. Die am intensivsten beforschten Analyten einer Liquid Biopsy, die für die Diagnose und die Überwachung des Therapieerfolges herangezogen werden, sind zirkulierende Tumorzellen (CTCs) und die zirkulierende Tumor DNA (ctDNA). CTCs bieten die Möglichkeit, intakte Tumorzellen zu erfassen, was eine detaillierte Charakterisierung der Tumorzellmorphologie, der funktionellen Eigenschaften und sogar der Expression bestimmter Proteine ermöglicht. Dies kann Informationen über die Tumorerogenität, die Metastasenbildung und die EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) liefern. Die Analyse von CTCs kann auch die Grundlage für die Entwicklung von personalisierten Therapieansätzen und die Überwachung der Krankheitsprogression bilden.(52) Im Gegensatz dazu, geht man davon

aus, dass ctDNA von abgestorbenen Zellen stammt. Weitere Analyt einer Liquid Biopsy sind auch zirkulierende extrazelluläre Nukleinsäuren (zellfreie cfDNA) sowie extrazelluläre Vesikel und diverse Glykoproteine.(53) Ein Hauptunterschied zwischen CTCs und ctDNA liegt in ihrer Zusammensetzung.(52)

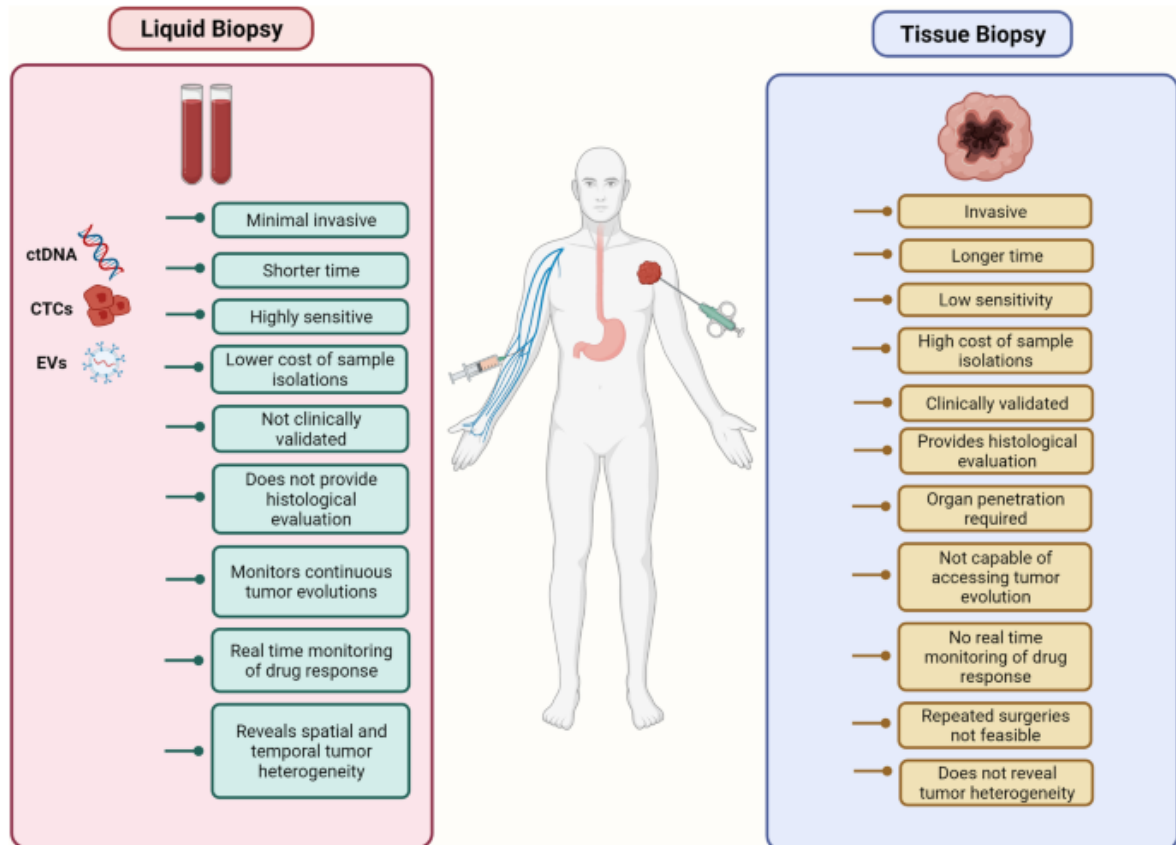


Abbildung 2: Vergleich von LB und Gewebebiopsie (Quelle: Lone et al. doi:<https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7>)

Abbildung 2 veranschaulicht einige Unterschiede zwischen LB und der herkömmlichen Gewebebiopsie. Einer der größten Vorteile von LB stellt die minimale Invasivität kombiniert mit der kurzen Zeitspanne bis zum Ergebnis dar. Weiters ermöglicht sie im Gegensatz zur Gewebebiopsie eine Echtzeitüberwachung von beispielsweise Therapieansätzen oder Tumorverhalten. Auch das Problem der Zugänglichkeit gewisser Tumore ergibt sich bei der LB nicht.

LB umfasst sowohl die genomische als auch die proteomische Bewertung einer Vielzahl von Bestandteilen des Tumors, wie z.B. zirkulierende Tumorzellen (CTCs), die von sowohl primären als auch metastasierenden Tumoren abgegeben werden, zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA), tumorabgeleitete extrazelluläre Vesikel (EVs), tumor erzeugte Blutplättchen (TEPs) und zirkulierende zellfreie RNA (cfRNA).

Zusammen genommen können diese tumorbedingten Bestandteile wichtige Informationen und Daten für eine genauere Diagnose sowohl bei primären als auch bei metastasierten Tumoren liefern. LBs reflektieren das gesamte Spektrum an genetischen und epigenetischen Alterationen des Tumors wie Mutationen, Kopiezahlveränderungen (CNAs, epigenetische Veränderungen etc.(54) . Genau Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Tumors sind möglich, da Tumor-Biomarker spezifisch sind und eine genaue Unterscheidung zwischen gesunden Personen und Krebspatient*innen ermöglichen.(55)

1.5.1 Cf DNA

cfDNA wurde erstmals 1948, in Zusammenhang mit Lupus Erythematodes, beschrieben,(56) in Verbindung mit Krebs wurde sie jedoch erstmals 1977 von Leon et al. gebracht.(57) Zirkulierende Tumorzellen gelten nicht als die Hauptquelle von cfDNA. Die Menge an cfDNA im Blut ist deutlich größer als die Anzahl der CTCs (Bei Krebspatient*innen macht die ctDNA etwa 0,1-89% der gesamten cfDNA aus).(58,59) Ein beträchtlicher Teil der cfDNA besteht aus nicht mutierter DNA. Der Großteil der cfDNA stammt aus dem Umfeld des Tumors oder aus Zellen, die in die antitumorale Immunantwort involviert sind. Untersuchungen von Methylierungsmustern in cfDNA zeigen, dass die Mehrheit der cfDNAs hämatopoetischen Ursprungs ist.(60–63) Ebenfalls stammen Teile der cfDNAs von anderen Zelltypen wie vaskulären Endothelzellen, Neuronen oder Hepatozyten. Der größte Teil der cfDNA bei Patient*innen mit Krebs stammt aus dem ursprünglichen Tumorgewebe.(64) Im Gegensatz zu ctDNA wird zellfreie DNA (cfDNA) sowohl von Krebszellen als auch von gesunden Zellen des Körpers freigesetzt und zirkuliert im Blutkreislauf. Sie kann aus nicht transformierten Geweben wie Stroma oder dem Immunsystem stammen. Eine erhöhte cfDNA-Konzentration gilt jedoch nicht sofort als maligne.(65) Erhöhte Spiegel wurden auch im Kreislauf von Schwangeren und bei Transplantations-Patient*innen nachgewiesen.(66) Weiters kann der Spiegel von cfDNA durch Entzündungen, Diabetes, Gewebetraumata, Sepsis oder Herzinfarkt ansteigen.(67,68) Reagiert das Immunsystem und sein Gewebe auf das Vorhandensein eines Tumors oder seiner Metastase(n), so kann dies sehr wichtig

für die Diagnose sein. cf-DNA die vom Tumor stammt, trägt alle Informationen zu ihm in sich. Eine LB aus solcher cfDNA ist von großer Bedeutung für die Behandlung sowie die Diagnose und Therapie.(69) Diese Variante bietet sich an, da sie einfach, kostengünstig und schnell ist. cf DNA kann mittels einer Blutabnahme gewonnen und anschließender DNA-Isolierung identifiziert werden. Die Konzentration von cfDNA im Blut variiert von 5 bis >1000 ng/ml bei Krebspatient*innen und von 0 bis 100 ng/ml bei gesunden Personen. (70,71) Das Problem hierbei ist jedoch, dass cf-DNA, wie bereits erwähnt, nicht unbedingt tumorspezifisch sein muss, und somit nicht so genau und auskunftreich, wie beispielsweise eine CTC ist.(72) Sie werden hauptsächlich eingesetzt, um nach genetischen Varianten zu suchen, die mit erblichen oder genetischen Erkrankungen in Verbindung stehen. Beispielsweise wird die pränatale cf-DNA-Testung in der Schwangerschaft eingesetzt, um die fetale DNA im Blut der Mutter zu untersuchen. Die cf-DNA-Testung wird auch zur Erkennung und Charakterisierung einiger Krebsarten sowie zur Überwachung von Krebstherapien verwendet. Durch die Analyse der cf-DNA können spezifische genetische Mutationen, die mit der Krankheit zusammenhängen, identifiziert werden.(73)

1.5.2 Ct DNA

Als ctDNA bezeichnet man stark fragmentierte DNA im Blutkreislauf, die von Tumoren stammt und nicht mit Zellen assoziiert ist. CtDNA ist stark fragmentiert und variiert in der Größe von 90 bis 10.000 bp (74), ihre Halbwertszeit ist nicht immer gleich und kann von 8 bis zu 147 Minuten andauern. (75) Die Menge an ctDNA im Blutkreislauf hängt sehr stark von der Tumorbiologie sowie der Tumorlast ab.(75) Mutationen in der ctDNA können verwendet werden, um Tumore zu überwachen. Nicht nur die Konzentration der ctDNA im Blut, sondern ebenso die Anzahl somatischer Veränderungen innerhalb einer Probe können Auskunft über das Tumorstadium, seine Größe und Aggressivität geben und können auch zur Therapieüberwachung dienen. Es gibt jedoch auch Limitationen von der Untersuchung von ctDNA, so kann es durch altersbedingte Blutzellveränderungen, der sog. klonalen Hämatopoese fälschlicherweise den Anschein machen, als wären diese vom Tumor verursacht. Dies kann in der Regel jedoch mittels Sequenzierung

von physiologischem Kontrollgewebe erkannt werden.(76) CtDNA ist ein wichtiger Indikator zur Überwachung der Evolution und Behandlung von Tumoren. In einer randomisierten Phase-III-Studie (PALOMA-3) wurde der Einfluss der CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Fulvestrant auf Frauen mit fortgeschrittenem Brustkrebs untersucht. Dabei zeigten sich quantitative Veränderungen von Mutationen des *PIK3CA*-Gens i der ctDNA in Blutproben nach 15 Tagen Behandlung. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung einer frühzeitigen Erkennung von ctDNA als potenziellen Biomarker für die Wirksamkeit von CDK4/6-Inhibitoren.(77)

1.5.3 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

CTCs werden anfangs von den primären Tumoren im Gewebe freigesetzt. In Bezug auf die Anzahl ist ihr Anteil im Blut ziemlich gering, mit ungefähr 1-10 CTCs pro Million Leukozyten.(78) Abhängig von Stadium oder Art des Tumors variieren CTCs in ihrer Form und Anzahl. Des Weiteren entwickeln CTCs sich zu Aggregaten. Sie lagern sich an Zellen wie Fibroblasten, Blutplättchen etc. an, und gelangen so an weiter entfernte Regionen im Körper.(79) Besagte Zellen stammen vom Tumor und gelangen in den Blutkreislauf, wo sie in der Regel 1-2,5 Stunden überleben, bevor sie vom Immunsystem detektiert und zerstört werden. Eine geringe Anzahl dieser Zellen kann jedoch überleben und entfernte Organe besiedeln und Metastasen bilden.(80)

Metastasenbildung von Tumoren ist Hauptursache für die Mortalität bei Krebserkrankungen. CTCs gelangen in die Blutgefäße und die Lymphbahnen.(81) und können wiederum in andere Organe einwandern. Bei erfolgreicher Vermehrung sowie Ausbreitung nisten sich Tumorzellen zuerst in das umliegende und später auch in entferntes Gewebe ein. CTCs können isoliert werden, um Informationen über den Tumor zu liefern und sind von sehr großem klinischen Interesse. Sie geben beispielsweise Auskunft über den transkriptomischen, den genomischen sowie den proteomischen Aufbau eines Tumors. In einer Kultur gezüchtet, können auch funktionelle Assays mit CTCs durchgeführt werden. Das was die CTCs für in der Tumordiagnostik so wertvoll macht, ist die Bereitstellung von Daten zum Tumorstatus in Echtzeit. Es wurde gezeigt, dass die CTC-

Werte sich auf eine dynamischere Weise verändern und parallel zum Tumorstatus mit größerer Genauigkeit als herkömmliche Biomarker im Blut verlaufen. Ebenfalls lässt eine Änderung der CTCs-Anzahl auf das Ansprechen auf eine Therapie rückschließen. (82) CTCs sind ebenfalls wichtige Marker, die helfen können, eine Chemoresistenz zu identifizieren. Diese hängt mit einer schlechteren Prognose bei frühem Brustkrebs zusammen.(83)

Die Isolierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) kann wertvolle Informationen über epigenetische Veränderungen verschiedener tumorrelevanter Gene bei Krebserkrankungen liefern. Zum Beispiel wurden epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen und Metastasen unterdrückenden Genen wie *SOX17*, *BRMS1* und *CST6* in EpCAM+ CTCs von Brustkrebspatienten mit einer erhöhten Metastasierung sowie einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht.(84)

Ein konzeptioneller Vorteil dieses Ansatzes ist, dass nachweisbare Veränderungen in der CTCs per Definition klonal sind und somit auf eine zugrunde liegende Population von Zellen mit identischen somatischen Mutationen hinweisen. Die hohe Spezifität der CTC-Detektion im Vergleich zu anderen blutbasierten Biomarkern wird dadurch gewährleistet, dass Biomarker wie CEA auch in anderen, nicht von Krebs betroffenen Geweben, bei gesunden Patient*innen erhöht sein können.(85)

Anreicherung

Aktuell gibt es hauptsächlich zwei Methoden zur Anreicherung CTCs: immunbasierte Anreicherungsmethoden und physikalische Anreicherungsmethoden. Die immunbasierten Methoden lassen sich in Immunomagnetperlen-Methoden und Immunadsorptionsmethoden unter Verwendung eines Mikrofluidik-Chips unterteilen. Immunomagnetperlen-Methoden umfassen sowohl eine positive Anreicherungsmethode als auch eine negative Anreicherungsmethode. Das CellSearch-System ist ein repräsentatives Produkt für die positive Anreicherung von CTCs basierend auf der Immunomagnetperlen-Methode. Dieses System kann Zellen automatisch fotografieren, zählen und analysieren. Eine negative Anreicherungsmethode mittels Immunomagnetperlen erfolgt durch Entfernung von Hintergrundblutzellen und Anreicherung von CTCs.

Immunadsorptionsmethoden basieren auf Mikrofluidik-Chips, wobei der CTC-Chip die schnellste Verarbeitungsgeschwindigkeit der vier Chips aufweist.(86)

Die physikalische Anreicherungsmethode nutzt Unterschiede in Größe, relativer Dichte und elektrischen Eigenschaften zwischen CTCs und Blutzellen zur Anreicherung von CTCs. Durch die Verwendung der oben genannten Anreicherungsmethode bei der Verarbeitung des peripheren Blutes wird der Hintergrund an Blutzellen reduziert, sodass die verbleibenden Zellpopulationen detektiert und analysiert werden können. Gegenwärtig umfassen die Nachweismethoden von CTCs hauptsächlich die Immunfluoreszenzmarkierung, RNA-In-situ-Hybridisierung, fluoreszenzbasierte quantitative PCR und Durchflusszytometrie.(87)

1.5.4 Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel (EVs) werden, sowohl von gesunden als auch kranken Zellen freigesetzt. EVs enthalten eine Vielzahl von funktionellen Molekülen wie Proteine, Nukleinsäuren und Lipide. Sie sind 30 bis 100 nm klein und von einer Membran umhüllt.(88,89) Sie werden von Zellen abgesondert und können in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin, Liquor und Speichel detektiert werden.(90) Obwohl EVs ursprünglich kein diagnostischer Nutzen zugesprochen wurde, ist mittlerweile bekannt, dass EVs eine entscheidende Rolle in unterschiedlichen Formen der Zell-zu-Zell-Kommunikation spielen. Da Tumoren nachweislich eine große Menge solcher EVs absondern, sind auch größere Mengen davon im Plasma von Patient*innen vorhanden. (91) Sie können sowohl auf benachbarte Zellen als auch auf entfernte Gewebe wirken. Da der Inhalt von EV von der Ursprungszelle abhängt, können Unterschiede in ihrer Zusammensetzung dazu beitragen, pathologische Veränderungen in den ursprünglichen Zelltypen zu erkennen. Daher werden EV als potenzielle Biomarker vor allem auch für die klinische Diagnostik von pathologisch verändertem Gewebe betrachtet.(92)

1.5.5 Vorteile und Nachteile von Liquid Biopsy

Eine Einschränkung von Gewebebiopsien besteht darin, dass die DNA aus einer speziellen Stelle des Tumors entnommen wird. Es ist also schwierig, Tumorproben sowohl in ausreichender Menge als auch in ausreichender Qualität zu erhalten. Befinden sich die Metastasen an verschiedenen Orten, so sind mehrere Biopsien, also mehrere Eingriffe, notwendig. Weiters stellt die Gewinnung von Biopsie-Proben durch invasive Methoden während der Behandlung zur Überwachung von Tumorreaktionen und -rezidiven auch eine große Herausforderung bei der Tumorprofilierung dar. Die Heterogenität von komplett resezierten Tumorproben begrenzt ebenfalls den Einsatz solcher invasiver Methoden.(93)

Zudem stellt eine Gewebibiopsie nur eine Momentaufnahme des Tumorgeschehens dar. Intratumor-Heterogenität sowie Heterogenität zwischen einzelne Tumorlokalisationen, erschweren es weiter, die Gesamtheit des Tumors zu untersuchen. CTCs und ctDNA können von mehreren metastatischen Lokalisationen freigesetzt werden und spiegeln daher die Gewebeheterogenität besser wider als besagte Gewebibiopsien.(94) Auf der anderen Seite erfordert die Notwendigkeit extrem sensitiver Techniken zur genomischen Untersuchung von CTCs und ctDNA oft eine höhere Anzahl positiver genomischer Veränderungen im Gewebe(95). Die Extraktion der ctDNA gilt als sehr heikel, da sie sehr leicht abgebaut werden oder verloren gehen kann. Was jedoch einen riesigen Vorteil darstellt ist, dass CTCs und ctDNA rein durch eine Blutabnahme, eine massive Aussagekraft vorweisen und somit eine gezielte Therapie sowie deren Überwachung gewährleisten zu können. (96) Die Heterogenität von Tumoren stellt ebenfalls eine Herausforderung für die ctDNA-Analyse dar. Da Tumorzellen genetisch und epigenetisch unterschiedlich sein können, kann die ctDNA-Analyse möglicherweise nicht alle vorhandenen genetischen Veränderungen erfassen, speziell wenn nur wenig ctDNA freigesetzt wie es bei frühen Tumorstadien der Fall ist. Es ist möglich, dass bestimmte subklonale Tumorpopulationen in der ctDNA nicht repräsentiert sind, was zu einem unvollständigen Bild des Tumorprofils führen kann.(97)

Ein weiteres Problem stellen technische Faktoren wie Probennachweisgrenzen, Verunreinigungen oder Störfaktoren dar. Sie beeinflussen die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der ctDNA-Analyse. Die Standardisierung der Analysemethoden und die Durchführung von Kontrollen sind entscheidend, um konsistente und verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Um eine valide Qualitätskontrolle einführen zu können bedarf es jedoch noch einiges an Arbeit.(98)

1.5.6 Wo wird LB bereits genutzt?

Die Detektion der Methylierung des SEPT9-Gens ist der erste vom US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassene blutbasierte Screening-Test für Darmkrebs (CRC) und zeigte eine höhere Sensitivität und Spezifität als Proteinmarker. Diese Methode wird seit mehr als 18 Jahren als Biomarker für Darmkrebs (CRC) betrachtet und wird seit über 14 Jahren klinisch eingesetzt. Diverse Studien haben veranschaulicht, dass die Methode als zuverlässig, schnell und praktisch für die Früherkennung von CRC erwiesen hat.(99)

Die Weiterentwicklung hochsensitiver, auf LB basierender Assays ermöglicht die Erkennung und Charakterisierung der minimalen Restkrankheit (MRD). Diese Assays können helfen, das Vorhandensein von Tumorzellen die sich von einem Primärtumor gelöst, und zu weiter entfernten Orten im Körper ausgebreitet haben, zu identifizieren, auch wenn keine klinischen oder radiologischen Anzeichen für Metastasen vorliegen. LB-Assays werden eingesetzt, um MRD zu überwachen und neue Medikamente zu entwickeln, die verbliebene Tumorzellen bei Patient*innen mit hohem Risiko auf eine Wiedererkrankung nach primärer Therapie effektiv eliminieren oder kontrollieren können. Etliche Biomarker, darunter ctDNA, CTCs, zirkulierende endotheliale Zellen (CEC), exosomale Mikro-RNA (exo-miRNA), die Analyse der Thrombozytenaggregation etc. werden zur Überwachung der Behandlungsreaktion bei Patient*innen eingesetzt. Dies wird nicht nur bei Brustkrebs, sondern auch bei anderen Tumorarten wie Dickdarm- und Blasenkrebs angewandt.(100)

Die Entwicklung von Arzneimittelresistenzen stellt ein weiteres großes Hindernis für den Erfolg von Krebstherapien dar und ist für über 90% der Todesfälle bei Krebs-

Patient*innen verantwortlich, die herkömmliche Chemotherapien oder zielgerichtete Medikamente erhalten. Arzneimittelresistenzen können durch verschiedene Mechanismen wie erhöhte Verstoffwechslung von Medikamenten, verstärkte Ausleitung der Medikamente aus den Zellen, Wachstumsfaktoren, gesteigerte DNA-Reparaturkapazität und genetische Faktoren (Mutationen, Amplifikationen, epigenetische Veränderungen) entstehen. Die Analyse von Flüssigbiopsien bietet hierbei eine enorm vielversprechende, nicht-invasive Methode, um die wirksamsten und gezieltesten Behandlungsentscheidungen zu treffen.(101)

2 Ziel der Arbeit

Liquid Biopsy ist ein vielversprechendes Werkzeug zu Therapieüberwachung sowie zur prognostischen Beurteilung von Krebserkrankungen. Mittlerweile behauptet sich diese Methodik auch immer mehr bei der Früherkennung von Krebserkrankungen. Dieses Gebiet ist jedoch noch vergleichsweise jung und weist dementsprechenden Forschungsbedarf auf. Das Potenzial einer mutationsbasierten Identifizierung von ctDNA wird aktuell auch in der Früherkennung erkannt und erforscht. Die beobachteten Nachweisraten von Sensitivität und Spezifität variieren je nach Art der Tumorerkrankung, sind jedoch bei Tumorerkrankungen in frühen Stadien niedriger.(102) In dieser Arbeit sollen die Vor- und Nachteile von LB, ihre mögliche Rolle in der Krebsfrüherkennung, sowie die Limitationen besagter Methode angeführt und diskutiert werden. In weiterer Folge wird direkt auf die Möglichkeit der Früherkennung von Brustkrebs eingegangen.

Fragestellung: Kann Liquid Biopsy in Zukunft als zielgerichtete Frühdiagnostikmethode bei Brustkrebserkrankungen als Goldstandardmethode etabliert werden?

Hypothese: Liquid Biopsy basierte Früherkennungsmethoden können in Zukunft bildgebende Screeningverfahren ergänzen beziehungsweise ablösen.

3 Resultate

3.1 Methoden der LB-basierten Krebsfrüherkennung

- 1.) Eine vielversprechende Methode ist die Analyse der zellfreien DNA, diese bietet mehrere Vorteile. Einerseits kann mutierte cfDNA bereits in einem sehr frühen Stadium erkannt werden, noch bevor herkömmliche klinische Messungen anschlagen.(103) Dies gewährleistet ein größeres Zeitfenster für ein frühes Einschreiten. Weiters ermöglichen cfDNA-basierte Tests die zeitgleiche Erkennung mehrerer Tumorarten und geben Informationen über das Ursprungsgewebe. (104) Dagegen untersuchen herkömmliche Methoden wie die Tissue Biopsy in der Regel nur einen spezifischen Tumor zu einem Zeitpunkt. Schließlich bietet cfDNA mit geringem Aufwand die Möglichkeit, das gesamte molekulare und genetische Profil zu erfassen, unabhängig von der Heterogenität innerhalb des Tumors.(34)
- 2.) Die herkömmliche Next-Generation-Sequenzierung (NGS) ist jedoch nicht sensibel genug, um geringe Mengen zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) im Blut zu analysieren. Daher wurde von Phallen et al. eine neue Methode namens gezielte Fehlerkorrektur-Sequenzierung (TEC-Seq) entwickelt, die eine sensitive und spezifische Detektion von seltenen Sequenzveränderungen in ctDNA ermöglicht. Diese Methode basiert auf der gezielten Erfassung mehrerer Genomregionen und einer tiefen Sequenzierung (~30.000-fache Abdeckung) von DNA-Fragmenten. In der Studie wurden 58 Gene (80.930 erfasste bp) analysiert, die bei verschiedenen Krebsarten häufig mutiert sind. In der Studie wurden verschiedene Schritte durchgeführt, um seltene tumorspezifische Veränderungen in DNA-Molekülen zu analysieren und mögliche Fehlerquellen zu eliminieren. Diese Schritte umfassten:
- 3.) Optimierung der Erstellung von DNA-Librarys und Erfassung der zirkulierenden freien DNA (cfDNA) für nachfolgende Analysen.
- 4.) Maximierung der Darstellung einzigartiger cfDNA-Moleküle durch Positionsabbildung und die Verwendung einer kleinen Anzahl vorab festgelegter Barcodes.

- 5.) Redundante Sequenzierung, bei der mehrere identische DNA-Moleküle erzeugt und sequenziert wurden, um jegliche Unterschiede in den Sequenzen abzustimmen.
- 6.) Filterung von Abbildungs- und Sequenzierungsartefakten, um potenzielle Fehlerquellen auszuschließen.
- 7.) Identifizierung und Entfernung von Veränderungen in der Keimbahn und hämatopoetischen Zellproliferation, die nicht relevant für die Analyse von tumorspezifischen Veränderungen sind.(105)

Diese Schritte ermöglichten eine genaue und zuverlässige Analyse seltener tumorspezifischer DNA-Veränderungen in ctDNA und halfen, potenzielle Störfaktoren zu minimieren. Frühe Krebsstadien weisen etwa <0,1% ctDNA (10 ctDNA-Kopien pro 5 mL) auf, während bei nicht-metastasierenden fortgeschrittenen Krebspatient*innen und bei Stadium-IV-Patient*innen 100–1000 Kopien pro 5 mL (bis zu 10%) nachgewiesen wurden.(106)

Auch die Analyse der Fragmentierungsmuster der cfDNA kann Aufschluss über Tumorerkrankungen bieten und sich in Zukunft als Ansatz für die Krebsfrüherkennung eignen. (107) Es wurde festgestellt, dass cfDNA, die von Krebszellen stammt, eine größere Variabilität in der Länge aufweist als cfDNA von nicht-krebsartigen Zellen. Diese Variation in der Größe der cfDNA-Fragmente könnte möglicherweise als unterscheidendes Merkmal zwischen gesunder cfDNA und jener von Krebspatient*innen dienen.(108,109) Aktuelle Erkenntnisse über die cfDNA-Fragmentierung haben zahlreiche aufstrebende Fragment-basierte Marker enthüllt, einschließlich Fragmentgrößen (110), präferierter Enden(111), Endmotiven(112), einsträngiger gezackter Enden und nukleosomaler Fußabdrücke.(113) Es wurde nachgewiesen, dass die charakteristischen Fragmentierungen in einem intrinsischen biologischen Zusammenhang mit den Aktivitäten verschiedener DNA-Nukleasen stehen.(114)

Auch CTCs bieten einen Ansatz für LB-basierte Früherkennungsverfahren. CTCs verbreiten sich, wie in Kapitel 1.5.3 beschrieben, durch den epithelialen-mesenchymalen Übergang (EMT), bei dem Zellen ihre epithelialen Merkmale verlieren und mesenchymale Eigenschaften annehmen. Die derzeitige Isolierung von CTCs basiert auf affinitätsbasierten Ansätzen, die auf der Expression des

epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (EpCAM) beruhen.(115) Die Analyse von CTCs ermöglicht den nicht-invasiven direkten Nachweis von Tumorerkrankungen in frühen Stadien verschiedener Krebsarten.

Eine weitere Methode die unlängst viel Aufmerksamkeit bekam ist die Analyse von DNA-Methylierung (DNAm) in cfDNA-Proben. DNAm ist ein entscheidender Faktor in der Genregulation und einer der am intensivsten erforschten epigenetischen Mechanismen. Viele Wissenschaftler*Innen sind dabei zu untersuchen wie DNAm eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren, deren Fortschreiten und der Resistenz gegen gezielte Therapien spielt. Epigenetische Veränderungen wie die DNA-Methylierung, können erklären, wie Umweltfaktoren das Krebsrisiko erhöhen. In Krebszellen ist die normale Regulation der Genexpression gestört, durch globale genomische Hypomethylierung und dichte Hypermethylierung von CpG-Inseln. Dies führt zu chromosomaler Instabilität. Die Analyse der DNA-Methylierung ermöglicht eine höhere Sensitivität als die mutationsbasierte Detektion von Krebs, da abnormale Methylierung sowohl häufiger als auch weitreichender ist. DNA-Methylierung ist auch gewebespezifisch, daher kann die Analyse von cfDNA-Methylierung das Ursprungsgewebe eines Tumors aufdecken. Abnorme CpG-Insel-Methylierung kann als Biomarker für maligne Zellen dienen und ihr Verhalten vorhersagen, was sie zu einem potenziellen Ziel für zukünftige Therapien macht. Aufgrund dieser Erkenntnisse bieten DNAm-basierte Biomarker vielversprechende Möglichkeiten zur Detektion, Überwachung und Charakterisierung von verschiedenen Tumorarten.(116–118)

3.2 Herausforderungen der LB-basierten Früherkennung

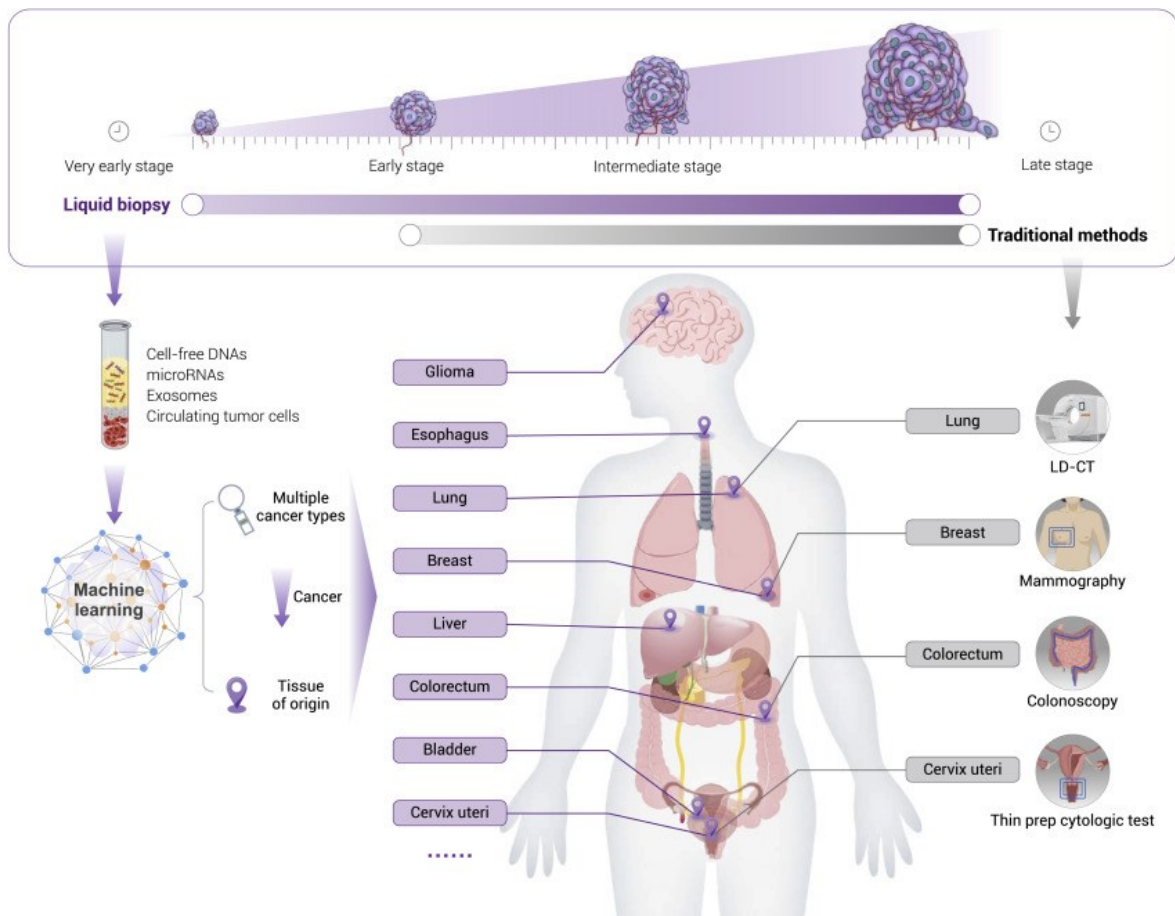


Abbildung 3: Liquid Biopsy als Anwendung zur Identifizierung von frühen Stadien verschiedener Tumorerkrankungen im Vergleich zu herkömmlichen Methoden. (Quelle: Gao et al. *Circulating cell-free DNA for cancer early detection*, <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100259>)

Theoretisch bietet die LB als Früherkennungsmethode eine attraktive Möglichkeit, um sehr früh an sehr viele, den Tumor betreffende, Informationen zu gelangen (Abb3). Speziell für Krebsarten für die derzeit keine empfohlenen Screening-Methoden existieren wie z.B. X X X X, wäre eine LB-basierte Früherkennung von großem Vorteil.

In der Theorie ist bereits in sehr frühen Stadien der Tumorentwicklung nachweisbares Material, in Form von Biomarkern, vorhanden, welches mit herkömmlichen Methoden jedoch erst sehr spät nachgewiesen werden kann. Beispiele hierfür sind zirkulierende Tumorzellen (CTCs), Exosomen, zirkulierende freie DNA (cfDNA), mRNA, miRNAs und Proteine. Einige dieser molekularen Veränderungen weisen auch gewebespezifische Muster auf, die dazu beitragen können, den Ursprung von Krebsgewebe zu identifizieren und die diagnostische Nachuntersuchung zu erleichtern. In der Praxis stellen jedoch die geringe Tumorlast

in frühen Stadien, stark fragmentierte cfDNA, sowie die unterschiedlichen Eigenschaften in den Freisetzungsraten von beispielsweise ctDNA verschiedener Tumore, ein Problem dar, welche es zu überwinden gilt.(119,120) Ebenfalls müssen Kosten und Nutzen einer solchen Methode in Relation zueinander gestellt werden, vor allem bei Tumorerkrankungen, bei denen es bereits geprüfte Früherkennungsmethoden gibt, beispielsweise bei Brustkrebs.(121)

Bei den meisten Krebspatient*innen macht ctDNA nur einen kleinen Anteil der gesamten zirkulierenden freien DNA (cfDNA) aus, besonders in frühen Krebsstadien. Dennoch kann ctDNA von normaler DNA durch spezifische genetische Veränderungen und unterschiedliche molekulare Größen unterschieden werden.(45) Die Konzentration von ctDNA bei asymptomatischen Tumor-Patient*innen liegt in etwa bei 1 bis 10 ng/mL. Um eine Sensitivität von 95% zu erreichen, würden etwa 150 bis 300 ml Blutprobe pro Test für die Brustkrebsvorsorge benötigt. (122) Dies ist zwar machbar, jedoch ist die Menge vergleichsweise groß. Um ein Gefühl dafür zu bekommen: bei einer Blutspende werden dem oder der Spender*in etwa 500 ml Blut entnommen. Verwendet man eine andere Methode, beispielsweise jene der Krebs-Biomarker, so genügt ein einzelnes Serumröhrchen. Auf der anderen Seite können ctDNA-Tests eine höhere Sensitivität und Spezifität als krebsbedingte Antigene, wie das prostataspezifische Antigen (PSA), das karzinoembryonale Antigen und die karbohydrat-assoziierten Antigene (CA) 19-9, CA 15-3 und CA-125, vorweisen.(123)

Bei der Früherkennung mittels CTCs erschweren ihre geringe Anzahl im Blut und ihre Verdünnung durch Blutzellen die technische Detektion, insbesondere bei frühem Brustkrebs. Derzeit ist die CellSearch®-Plattform die einzige FDA-zugelassene Methode zur Isolierung von CTCs, basierend auf der EpCAM-Expression. Allerdings ist EpCAM bei den aggressivsten Krebszellen, die den epithelial-mesenchymalen Übergang (EMT) durchlaufen, herunterreguliert, was dazu führt, dass die CellSearch®-Plattform die meisten CTCs im fortgeschrittenen Brustkrebsstadium nicht erfasst. Zusätzlich inaktivieren aktuelle biologische Techniken die CTCs, was ihre Anwendung in der klinischen Praxis beeinträchtigt. Daher besteht ein dringender Bedarf an einer milden und spezifischen Technik zur In-vitro-Isolierung von CTCs.(124)(115)

In einer Studie von Jillian Phallen et al. wurden Plasmaproben von insgesamt 194 Patient*innen mit Brustkrebs, Dickdarmkrebs, Lungenkrebs und Eierstockkrebs analysiert. Die Patient*innen befanden sich entweder im lokalisierten oder metastasierten Stadium der Krankheit, wobei die Mehrheit der Diagnosen in den Stadien I und II gestellt wurde. Die Forscher*innen stellten fest, dass die Konzentration von cfDNA im Plasma von Krebspatient*innen im Durchschnitt etwa 29 ng/ml Plasma betrug, was signifikant höher war als bei gesunden Personen (im Durchschnitt 7 ng/ml Plasma). Insbesondere in der Kohorte von Patient*innen mit Dickdarmkrebs zeigte sich, dass diejenigen mit metastasierter Erkrankung eine höhere cfDNA-Konzentration aufwiesen als diejenigen mit früheren Stadien. (125) Dies weist darauf hin, dass LB ein sehr gutes Tool für die Therapieüberwachung sein kann, die geringe Menge an cfDNA beziehungsweise ctDNA bei Patient*innen in frühen oder noch nicht metastasierenden Stadien sich jedoch als äußerst schwierig gestalten kann. Neben hoher Spezifität ist auch hohe Sensitivität notwendig, um geringe Tumorlast zu erkennen. Idealerweise sollte ein Screening-Test Krebs vor der Bildung von Metastasen diagnostizieren können, da er zu dem Zeitpunkt mit hoher Wahrscheinlichkeit noch durch einen chirurgischen Eingriff heilbar ist. (126)

3.3 Sensitivität und Spezifität LB-basierter Krebsfrüherkennungsmethoden

Obwohl die Analyse von ctDNA ein vielversprechender Ansatz in der Krebsforschung ist, gibt es auch einige Limitationen, die es zu berücksichtigen gilt. Da ctDNA nur in geringen Konzentrationen im Blutkreislauf zirkuliert ist es schwer sie zuverlässig nachzuweisen, insbesondere bei Patient*innen mit kleineren Tumoren oder frühen Stadien der Erkrankung. Diese Tatsache senkt die Sensitivität dieses Verfahrens. Die Entwicklung empfindlicherer Analysetechniken und die Optimierung der Probengewinnung und -verarbeitung sind notwendig, wenn diese Methode in der Routine etabliert werden soll. Ein weiteres Problem stellt die Spezifität der ctDNA-Analyse dar. Es kann vorkommen, dass genetische Veränderungen innerhalb der ctDNA auch in gesundem Gewebe oder anderen nicht-tumorbezogenen Zuständen bestehen. Dies kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen und die Interpretation der Analyse erschweren oder

verfälschen.(127) Eine hohe Spezifität ist für einen Pan-Cancer-Screening -Test der in der Routine etabliert werden soll Voraussetzung. Im besten Fall sollte diese 100% betragen, um die Möglichkeit potenzieller Schäden einer falsch positiven Diagnose möglichst gering zu halten. Dies gestaltet sich jedoch als sehr schwierig, denn mit hoher Spezifität senkt sich wiederum die Sensitivität. (120) Gerade bei der Früherkennung jedoch spielt die Sensitivität eine entscheidende Rolle, da sie benötigt wird, um bei geringer Tumorlast eine Diagnose stellen zu können. Ist die Sensitivität gering, so kann die Erkrankung erst in einem späteren Stadium detektiert werden.(119) Eine große Hürde stellen nicht vorhandene beziehungsweise unspezifische Tumormarker dar. Die aktuellen proteinbasierten Biomarker weisen neben ihrer hohen Spezifität einen wesentlichen Nachteil auf: Ihre Konzentrationen sind bei Patient*innen mit kleinen Tumoren selten erhöht und steigen oft erst dann an, wenn bereits Metastasen in anderen Geweben vorhanden sind. Wenn herkömmliche Biomarker bei Patient*innen mit vermeintlich lokalisiertem Krebs erhöht sind, deutet dies höchstwahrscheinlich auf das Vorhandensein von versteckten Metastasen hin. Daher haben die meisten Protein-Biomarker mit wenigen Ausnahmen (wie HCG oder PSA) nur begrenzten Wert bei der Früherkennung von Krebs in einem frühen Stadium.(128)

In einer Studie des Erasmus Medical Centers aus dem Jahr 2022 durchgeführt von Esmée K. J. van der Poort, Nicolien T. van Ravesteyn, Jeroen J. van den Broek und Harry J. de Koning wurden Früherkennungstests von Brustkrebs sowie DCIS (Duktalem Carcinoma in Situ), basierend auf LB, untersucht und mit einer Mammographie verglichen. Hierbei konnte eine LB mit einer Sensitivität von 91% für DCIS und einer Tumorgöße von 1,39 cm in der Routineuntersuchung von Frauen im Alter zwischen 50 und 74 Jahren 499.859 Fälle von invasivem Brustkrebs und 211.799 Fälle von DCIS erkennen. Dies führte zu einer kombinierten Sensitivität von 70% für invasiven Brustkrebs und DCIS. Wenn Liquid Biopsies jedoch nicht in der Lage waren, DCIS zu erkennen, war der Anteil der durch das Screening erkannten Brustkrebsfälle geringer. Eine Liquid Biopsy mit einer Sensitivität von 0% für DCIS und einer Tumorgöße von 1,39 cm hatte eine kombinierte Sensitivität von 62%. Unter der Annahme eines perfekten Screen-Tests mit einer kombinierten Sensitivität von bis zu 100% wurden deutlich mehr Brustkrebsfälle durch das Screening erkannt und weniger Fälle wurden außerhalb des Screenings

entdeckt.(129) Bisher gibt es bereits einige Tumorarten bei denen LB zur Diagnosesicherung auch in frühen Stadien angewandt werden kann, da sie für beispielsweise einige Arten von Lungenkrebs, wie das kleinzellige Lungenkarzinom, gut funktionieren. Verschiedene Kohortenstudien wiesen nach, dass ctDNA zur frühen Diagnose von Lungenkrebs (Stadium I oder II) eingesetzt werden und eine relativ hohe Sensitivität und Spezifität erreichen kann. KRAS und TP53 Mutationen können in Sputum-Proben von Patient*innen bis zu einem Jahr vor der Krebsdiagnose nachgewiesen werden.(130) Hierbei empfiehlt sich dieses Verfahren sogar, da es für Lungenkrebs derweil keine wirkliche Früherkennungsmethode gibt und auch die Gewebsbiopsie in späteren Stadien sehr aufwändig und strapaziös ist.

In dem Bemühen die Sensitivität zu verbessern, entwickelten Cohen et al. einen kombinierten Test namens CancerSEEK. Dieser Test soll sowohl DNA-Mutationen als auch Protein-Biomarker nachweisen. CancerSEEK erkennt Mutationen an 2.001 Stellen in 16 krebsspezifischen Genen und misst die Konzentration von acht Protein-Biomarkern. CancerSEEK wurde entwickelt um verschiedene Tumore in frühen Stadien, vor Bildung von Metastasen, erkennen zu können. CancerSEEK ist eine PCR-basierte Früherkennungsmethode, die es schafft gleichzeitig mehrere Regionen von Treibergenen, die häufig in verschiedenen Krebsarten mutiert sind, zu untersuchen.

Bei der Entwicklung zeigten sich folgende Herausforderungen:

- die ausreichende Anzahl von untersuchten Basen für eine breite Krebserkennung
- tausendfache Sequenzierung jeder Base für seltene Mutationen
- Begrenzung der untersuchten Basen, um Fehler zu vermeiden
- Kosteneffizienz für Hochdurchsatz-Analysen

Es zeigte sich, dass etwa 60 Amplicons das optimale Gleichgewicht zwischen Sensitivität und Kosteneffizienz darstellten. Eine Erhöhung der Anzahl der Amplicons würde nicht wesentlich mehr Krebsarten erkennen, sondern die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen erhöhen. Basierend darauf wurde ein Panel mit 61 Amplicons entwickelt, um Mutationen in 16 Genen bei verschiedenen Krebsarten zu erkennen. Das Panel sollte theoretisch 41% bis 95%

der Krebsarten in ihrem Datensatz erkennen. In der Praxis funktionierte es besser. Es erkannte mindestens eine Mutation in 82% der untersuchten Krebsarten, zwei Mutationen in 47% und mehr als zwei Mutationen in 8%. Die vorhergesagte maximale Erkennungsfähigkeit der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) in ihrer Studie variierte je nach Tumorart, von 60% bei Leberkrebs bis zu 100% bei Eierstockkrebs. Daraufhin folgte eine Studie mit 1005 Patient*innen, welche an Stadium I bis III Eierstock-, Leber-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen-, Speiseröhren-, Dickdarm-, Lungen- oder Brustkrebs erkrankt waren. Diese Patient*innen hatten zuvor keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten und es lagen auch keine Fernmetastasen vor. Das Durchschnittsalter bei der Diagnose betrug 64 Jahre. CancerSEEK analysierte die Spiegel von acht Proteinen und das Vorhandensein von Mutationen an 1933 verschiedenen genomischen Positionen. Die Spezifität des Tests betrug über 99%, und nur 7 von 812 gesunden Personen erhielten falsch-positive Ergebnisse. Die Forscher verwendeten strenge statistische Methoden, um die Genauigkeit des Tests zu gewährleisten, und verwendeten Kreuzvalidierungen, um die Ergebnisse zu überprüfen. Die Ergebnisse zeigten vielversprechende Ergebnisse für die Früherkennung von Krebsarten, die bisher keine etablierten blutbasierten Tests hatten.(131)

Die durchschnittliche Sensitivität von CancerSEEK für die acht untersuchten Krebsarten lag bei 70% und schwankte je nach Krebsart zwischen 98% bei Eierstockkrebs und 33% bei Brustkrebs. Bei dieser Sensitivität betrug die Spezifität mehr als 99%, und nur 7 von 812 gesunden Personen erhielten ein falsch-positives Ergebnis.(131) Diese Daten weisen auf ein vielversprechendes Panel zur Krebsfrüherkennung für diverse Krebsarten hin. Bei Brustkrebs jedoch scheint diese Methode noch nicht jene zu sein die, zumindest zum jetzigen Zeitpunkt, ihren Weg in die Routine findet. Für diesen Schritt muss bei CancerSEEK noch an der Sensitivität gearbeitet werden. Hierbei ist das Problem jedoch momentan noch der Preis, denn wenn die Sensitivität steigt so steigen wie bereits erwähnt auch die Kosten mit ihr. Somit ist diese Methode nicht mehr so rentabel zur Frühdiagnostik, wie beispielsweise die Mammographie oder andere etablierte Methoden.

Im Vergleich zu normalem gesunden Gewebe zeigt DNA in Tumoren abnorme Methylierungsmuster. Es kommt zu einer zunehmenden Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotoren und einem Verlust von CpG-Methylierung in Nicht-CpG-

Insel-Promotoren. Diese Veränderungen treten frühzeitig in der Entstehung von Krebs auf und scheinen spezifisch für bestimmte Tumorarten zu sein.(132) Abweichend methylierte DNA kann im Blut nachgewiesen werden und könnte somit für die frühzeitige Krebsdiagnose verwendet werden. Methylierungs-basierte Tests bieten gegenüber Mutationen einige Vorteile, wie eine größere Fülle und verbesserte Gewebespezifität.(133,134) Ein namhafter Test für die frühzeitige Krebserkennung ist der GRAIL-Test (auch Galleri), der gezielte Bisulfit-Sequenzierung der Plasma-DNA und maschinelles Lernen nutzt, um eine Panel von >100.000 informativen Methylierungs-Stellen zu analysieren. In einer Studie mit 6.689 Teilnehmer*Innen, darunter 2.482 Krebspatient*innen, erreichte der Test eine Gesamtsensitivität von 67,3% bei 12 vorab festgelegten Krebsarten in den Stadien I bis III. Die Spezifität betrug 99,3% mit einer geringen Falsch-Positiv-Rate von 0,7%. Die Sensitivität für über 50 verschiedene Krebsarten betrug im Stadium I 18%, im Stadium II 43%, im Stadium III 81% und im Stadium IV 93%. Bei bereits diagnostiziertem Krebs konnte der Test das Ursprungsgewebe in 93% der Fälle korrekt lokalisieren.(135) Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass dieser Test vor allem bei bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankungen (je nach Krebserkrankung ungefähr ab Stadium III oder II) vielversprechende Ergebnisse liefert. Oft sind in späteren Stadien der Erkrankung die Patient*innen in einem schlechten Allgemeinzustand, was einen operativen Eingriff, wie eine Gewebebiopsie, zu einer Gefahr macht. In diesem Fall ist eine solche Methode eine tolle Möglichkeit um den oder die Patient*in zu schonen und trotzdem zu den gewünschten, wenn nicht sogar noch präziseren, Ergebnissen zu kommen. Jedoch ist unter diesen Voraussetzungen, bei einer Sensitivität von 18% in Stadium I, keine realistische Chance gegeben, diese Methode auch in der Früherkennung von Tumorerkrankungen einzusetzen.

Christiano et al. beschäftigen sich ebenfalls mit LB-basierten Früherkennungsmethoden. Sie entwickelten DELFI (DNA evaluation of fragments for early interception), eine Methode die auch bei geringer Tumorlast hohe Sensitivität verspricht. DELFI wurde entwickelt, um eine große Anzahl von Mutationen der cfDNA mittels einer genomweiten Analyse der Fragmentierungsmuster zu erkennen. Die Methode basiert auf WGS (Whole Genome Sequencing) von isolierter cfDNA. Die zugeordneten Sequenzen werden

in nicht-überlappenden Fenstern über das gesamte Genom analysiert. Konzeptuell können die Fenster eine Größe von Tausenden bis Millionen von Basen haben. Für die Validierung der Fragmentierungsmuster von cfDNA haben Christiano et al. 5 Mb große Fenster verwendet, da diese mehr als 20.000 reads pro Fenster bei einer Genomabdeckung von 1-2x ermöglichten. Innerhalb jedes Fensters wurden die Abdeckung und Größenverteilung der cfDNA-Fragmente bei gesunden und Krebspopulationen untersucht. Bei der Analyse der Fragmentierungsmuster der cfDNA wurde festgestellt, dass gesunde Individuen Nukleosom-Muster von weißen Blutzellen in ihren cfDNA-Profilen aufwiesen, während bei Krebspatient*innen diese Fragmentierungsprofile mutiert waren. Im Zuge der Studie wurden die Fragmentierungsprofile von 236 Patient*innen mit Brust-, Darm-, Lungen-, Eierstock-, Bauchspeicheldrüsen-, Magen- oder Gallengangkrebs analysiert und mit jenen Profilen von 245 gesunden Personen verglichen. Die Studie identifizierte mehrere deutliche genomische Unterschiede in der cfDNA von Krebspatient*innen zu jener von gesunden Teilnehmer*innen. Diese Unterschiede betrafen sowohl Vergrößerungen als auch Verkleinerungen der Fragmente, an verschiedenen Stellen des Genoms. (34,109) Es wurde mittels Korrelationsanalyse die Konsistenz der cfDNA-Fragmente der beiden Personengruppen analysiert. Bei gesunden Personen zeigten die Profile eine hohe Konsistenz (mittlere Korrelation von 0,99). Daraus lässt sich ableiten, dass Personen ohne Tumor ähnliche cfDNA-Muster aufweisen. Im Gegensatz dazu betrug die mittlere Korrelation der cfDNA-Fragmentverhältnisse bei Krebspatienten 0,84. Dies weist darauf hin, dass es signifikante Unterschiede in den cfDNA-Fragmentierungsprofilen zwischen Krebspatienten und gesunden Personen gab. Durch die Studie lassen sich klare genetische Unterschiede in den Größen der cfDNA-Fragmentierungsmuster zwischen Krebspatient*innen und gesunden Personen nachweisen. Diese Unterschiede waren konstant und statistisch signifikant, selbst nachdem mögliche Einflüsse des GC-Gehalts berücksichtigt wurden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Analyse der cfDNA-Fragmentierung möglicherweise als diagnostisches oder prognostisches Werkzeug in der Krebsforschung verwendet werden kann.(109,136) Von insgesamt 208 von Christiano et al. untersuchten Krebspatient*innen wurden 152 erkannt, was einer Sensitivität von 73% entspricht. Bei 215 gesunden Personen wurden nur vier fälschlicherweise als krebskrank klassifiziert, dies entspricht einer Spezifität von 98%. Bei einem Schwellenwert von 95% Spezifität wurden 80% der

Krebspatient*innen erkannt, darunter 79% der operablen (Stadium I - III) und 82% der Patient*innen im Stadium IV.(109)

Tabelle 1: Übersicht von Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher LB-basierter Screeningmethoden

METHODE	SENSITIVITÄT		SPEZIFITÄT
CancerSEEK	$\emptyset = 70\%$		>90%
	Tumor-Art:		
	Brustkrebs	33%	
	Eierstockkrebs	98%	
GRAIL-Test	$\emptyset = 67,3\%$		99,3%
	Tumor-Stadium:		
	I	18%	
	II	43%	
	III	81%	
	IV	93%	
DELFI	$\emptyset = 73\%$		98%
	Tumor-Stadium:		95%
	I	79%	
	II		
	III		
	IV	82%	

Tabelle 1 veranschaulicht noch einmal die Sensitivität sowie die Spezifität der wichtigsten, oben im Text genannten Methoden. Mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 70% bei einer Spezifität von über 90% bietet CancerSEEK eine vielversprechende Methode zur Früherkennung von Krebs. Für Brustkrebs jedoch ist sie mit einer Sensitivität von 33% nicht in Frage kommend, da es zur Früherkennung die Mammographie gibt.

Eine Meta-Analyse durchgeführt von Suter et al. umfasste 8 Studien, (2003-2019 veröffentlicht) und insgesamt 945 untersuchte Läsionen mittels Mammographie. Die Resultate ergaben eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 77%.(137) In diesem Fall ist die Mammographie zur Früherkennung der CancerSEEK Methode

hinsichtlich der Sensitivität überlegen. Sehr interessant ist sie jedoch wieder bei Eierstockkrebs, bei dem es einerseits keine etablierte Screeningmethode gibt, CancerSEEK zusätzlich auch eine 98%ige Sensitivität vorhersagt. Dies könnte in der Diagnostik von Eierstockkrebs ein Durchbruch sein.

Auch der GRAIL-Test scheint mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 67,3% interessant. Da besagte Sensitivität in Stadium I jedoch durchschnittlich bei 18% liegt, ist diese also noch als Früherkennungsmethode ungeeignet. In späteren Stadien (III-IV) weist er eine solide Sensitivität zwischen 81% und 93% auf. Somit bietet er sehr wohl eine Screeningmethode mit Zukunft.

DELFI weist hingegen bereits in früheren Stadien eine durchschnittliche Sensitivität von 73% bei einer Spezifität von 98% auf. Reduziert man die Spezifität auf 95% so erhält man bereits ab Stadium I eine durchschnittliche Sensitivität von 79% und ab Stadium IV sogar 82%. Generell kann gesagt werden, dass alle Methoden bereits eine starke Spezifität aufweisen, an der Optimierung der Sensitivität einzelner jedoch muss noch gearbeitet werden. Bei Krebserkrankungen ohne bereits vorhandene Screeningmethode geben sie eine gute Basis für zukünftige Screening-Untersuchungen. Bei Krebsarten, welche bereits ein Schema haben nachdem gescreent wird (Prostatakarzinom, Brustkrebs, etc.) stellt sich die Frage der Wirksamkeit sowie des Kosten-Nutzenfaktors.

3.4 Kosten- Nutzenabschätzung von LB-basierten Krebsfrüherkennungsmethoden

Stand 2017 weist die digitale Mammographie eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 88% auf. Die Kosten in den USA betragen 149 USD pro Mammographie.(138,139) Unter Anwendung der derzeitigen, von der United States Preventive Services Task Force (USPSTF) empfohlenen, Strategie, gibt es aktuell 953 falsch-positive Befunde pro 1000 gescreenter Frauen zwischen 50 und 74 Jahren, die, in den USA, zweimal jährlich gescreent werden. Demnach erhalten Frauen wahrscheinlich in 13 Screening-Runden einen falsch-positiven Befund.(140) Im Gegensatz dazu werden bei einem Screening von 1000 Frauen 19 als falsch - positiv befundet.(141) In einer bereits in Kapitel 3.4 erwähnten Studie des Erasmus Medical Centers aus dem Jahr 2022 von Esmée K. J. van der Poort, Nicolien T. van

Ravesteyn, Jeroen J. van den Broek und Harry J. de Koning hatte eine höhere Spezifität positive Auswirkungen auf die gewonnenen QALYs (qualitätsbereinigte Lebensjahre) und senkte die Kosten auf allen Sensitivitätsniveaus. Das Modell besteht aus vier Hauptkomponenten: Bevölkerungsdemografie, Screening, dem natürlichen Verlauf von Brustkrebs und Behandlung. Das Screening-Modul simuliert verschiedene Screening-Strategien und den Anteil von DCIS (duktales Carcinoma in situ), der durch das Screening erkannt wird, was als DCIS-Sensitivität (%) bezeichnet wird. Die Komponente für den natürlichen Verlauf von Brustkrebs simuliert das kontinuierliche Tumorwachstum von invasivem Brustkrebs basierend auf verschiedenen Eingabemerkmale wie Tumorbiologie und Alter. Jeder simulierte Tumor hat einzigartige Größen für die Erkennbarkeit im Screening, die klinische Diagnose und die Mortalität. Die mittlere Größe eines Tumors bei der Erkennung im Screening bestimmt die Sensitivität für invasiven Brustkrebs. In MISCAN-Fadia, besagtem Mikrosimulationsmodell welches zur Erforschung von Auswirkungen von Brustkrebs-Screeningmethoden auf die Mortalität von Patientinnen zwischen 1975 und 2000 angewandt wurde, beeinflusst die Spezifität nicht die Reduktion der Mortalität oder die Anzahl der Überdiagnosen, sondern die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse. Falsch-positive Ergebnisse haben einen negativen Einfluss auf die gewonnenen QALYs und erhöhen die Gesamtkosten des Screenings, was letztendlich den Maximalpreis für die LBs steigert. (142)(143) Die Steigerung des Preises zur Qualitätssicherung reißt die LB in diesem Punkt wieder hinter die digitale Mammographie.

4 Materialien und Methoden

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine Literaturrecherche wobei der Schwerpunkt auf Liquid Biopsy in der Tumordiagnostik, speziell der Tumorfrüherkennung von Brustkrebs sowie der Therapieüberwachung von malignen Krebserkrankungen, liegt. Zu diesem Zweck wurden die gängigen wissenschaftlichen Datenbanken wie PubMed, OMIM, ClinVar, sowie diverse Online-Portale zu diesen Themen durchsucht, die Daten zusammengetragen, zusammengefasst und bewertet. Mittels Schlagwortsuche wurde sich immer weiter an das Thema herangetastet.

Suchbegriffe und Schlagworte zu Beginn waren beispielsweise „Liquid Biopsy“, „Circulating Tumor Cells AND Liquid Biopsy“, „CTCs AND ctDNA AND cancer“, „hereditary cancer AND Liquid Biopsy“, „oncogenes AND tumorigenesis“, „Early Cancer detection“, „tumor suppressor genes AND hereditary cancer“, „breast cancer AND targeted therapy“, „tumor markers AND ca 15-3“, „Ca15.3 AND CEA AND Breast Cancer“, „Breast Cancer (AND) Liquid Biopsy (AND) Mammography“, „CancerSEEK“, „multi-cancer (AND) early detection“ cfDNA (AND) fragmentation (AND) cancer.

5 Ausblick

In den letzten 25 Jahren wurden deutliche Fortschritte bei der Entwicklung von Targeted Therapies bei der Behandlung von Brustkrebs erzielt. Dies wurde unter anderem durch ein besseres Verständnis der treibenden Faktoren für die Proliferation und das Wachstum von Mammakarzinomen aus vielen individuellen Forschungsstudien sowie diversen Initiativen wie beispielsweise dem "The Cancer Genome Atlas" (NCI/NIH) erreicht. Ein bemerkenswerter Erfolg für zielgerichtete Therapien bei Brustkrebs ist die Entwicklung von Medikamenten gegen HER2, auch bekannt als ERBB2. Ebenso hat sich die letzten 10 Jahre hinweg auch das Spektrum der Therapien, die auf andere Signalwege, die am Tumorwachstum beteiligt sind abzielen, erheblich erweitert.(144)

Flüssige Biopsien (LB) zeigen vielversprechende Ergebnisse in der Anwendung der Immunonkologie und könnten bald in der klinischen Praxis eingesetzt werden. LB ermöglicht wiederholte Untersuchungen im Verlauf der Krankheit, um die Behandlungseffizienz zu überwachen. Die Quantifizierung von zirkulierender freier DNA (cfDNA) ist derzeit der fortschrittlichste Ansatz, während die Bewertung der Bluttumor-Mutationslast (bTMB) vielversprechende Ergebnisse liefert. Diese Methode muss jedoch noch ausgereift, standardisiert und in prospektiven Studien validiert werden. Die immunzytologische Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) ermöglicht die Bewertung wichtiger Proteine für Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Fortschrittliche Techniken wie die Bewertung des TCR-Repertoires und die T-Zell-Konvergenz zeigen ebenfalls vielversprechende

Ergebnisse und könnten zur Beurteilung der Immuncheckpoint-Inhibitor-Antwort dienen.(145)

In einer zwischen Dezember 2016 und April 2019 laufenden umfangreichen Studie durchgeführt von Nicholas C Turner, Prof, MD,a,d, Belinda Kingston, MB,a Lucy S Kilburn, MSc,b Sarah Kernaghan, BSc,b Andrew M Wardley, Prof, MD,e,f Iain R Macpherson, MD,g Richard D Baird, MD,h Rebecca Roylance, MD,i,j Peter Stephens, PhD,k Olga Oikonomidou, MD,l Jeremy P Braybrooke, FRCP,m Mark Tuthill, MRCP,n Jacinta Abraham, BMBS,o Matthew C Winter, MD,p Hannah Bye, PhD,q Michael Hubank, PhD,c,q Heidrun Gevensleben, MD,r Ros Cutts, PhD,a Claire Snowdon, MSc,b Daniel Rea, Prof, FRCP,s David Cameron, Prof, MD,l Abeer Shaaban, PhD,s Katrina Randle, MSc,t Sue Martin, BSc,b Katie Wilkinson, BSc,b Laura Moretti, MSc,b Judith M Bliss, Prof, MSc,b, and Alistair Ring, MDd, (finanziert von Cancer Research UK, AstraZeneca und Puma Biotechnology) zur ctDNA-Testung bei fortgeschrittenem Brustkrebs zeigte sich eine hohe Genauigkeit und Sensitivität der ctDNA-Testung mit einer starken Übereinstimmung zwischen verschiedenen Testverfahren. Die Studie umfasste über 1000 Patient*innen in Großbritannien und ermöglichte eine simultane Evaluierung mehrerer gezielter Behandlungsoptionen bei Brustkrebs. Die Verfügbarkeit und Genauigkeit der ctDNA-Testung waren vergleichbar mit der mutagen-basierten Gewebetestung, wobei nahezu alle Patient*innen Testergebnisse erhielten. Die Bearbeitungszeit für ctDNA-Tests war kurz, was zu einer hohen Umwandlungsrate von Patient*innen führte. Allerdings wurden bei niedriger Allelhäufigkeit von Mutationen einige Diskrepanzen in den ctDNA-Ergebnissen beobachtet, was auf weiteren Verbesserungsbedarf bei den Testverfahren hinweist. Insgesamt zeigte die ctDNA-Testung Potenzial, die mutagen-basierte Gewebebiopsie in der Patientenpopulation mit fortgeschrittenem Brustkrebs zu ersetzen. Gewebebiopsien bleiben jedoch weiterhin wichtig und zum jetzigen Stand noch nicht ersetzbar.(146)

6 Diskussion

Wie bereits in den vorigen Kapiteln erwähnt ist es also von großem Interesse eine Tumorerkrankung so früh wie möglich zu erkennen, um ihr entgegenwirken zu können. Den Vorteil, welchen die LB gegenüber anderen Methoden mit sich bringt, ist also die sehr geringe Invasivität dieses Verfahrens. Ebenso erweist sich die LB als kostengünstiger. Gewebebiopsien sind teurer, aufwendiger, und oft ungenauer. Einen weiteren Vorteil stellt die Möglichkeit der Therapieüberwachung dar. Anhand von Liquid Biopsy ist es möglich die Tumorentwicklung in Echtzeit mitzuverfolgen und so rasche Handlungsmöglichkeiten in den Therapieansätzen zu ermöglichen. Doch nicht allein in der Früherkennung scheint die Liquid Biopsy einige Vorteile mit sich zu bringen. Gerade in späteren Tumorstadien in denen die Patient*innen oft einen schlechten Allgemeinzustand aufweisen, ist die LB eine Methode, um Eigenschaften von inoperablen Tumoren an unerreichbaren Stellen zu analysieren, ohne die Patient*innen überzustrapazieren. Mit Sicherheit ein großes Problem stellt jedoch das Vorhandensein von CTCs oder ctDNA in Patient*innen-Proben dar. Die Suche nach geeignetem zellulären oder nicht zellulärem Material kann sehr stark schwanken, da die Anzahl von Tumorerkrankung zu Tumorerkrankung sowie von Patient*in zu Patient*in unterschiedlich und sogar tagesabhängig sein kann. Vor allem in frühen Stadien ist die Sensitivität verschiedener Verfahren die auf LB basieren oft niedrig und der Test somit nicht sehr aussagekräftig.(147)

6.1 Effektivität von Liquid Biopsy

Natürlich ist in der Theorie ein Pan-Cancer-Screeningtest anhand spezifischer Biomarker zur Früherkennung und Prognosestellung von Tumorerkrankungen ein sehr attraktives Tool. Jedoch bleibt fraglich ob gerade bei Brustkrebs, wo es bereits nachweislich wirkungsvolle spezifische Biomarker zur Therapieüberwachung, sowie die Mammographie als Goldstandardmethoden gibt, eine sinnvolle Methode, vor allem hinsichtlich des Kosten-Nutzenfaktors ist. Die Bedenken die seit Jahren bei der Mammographie bestehen sind einerseits die Strahlenexposition und andererseits die Gefahr der Überdiagnose. Nichtsdestotrotz gilt sie als solide,

wirkungsvolle Methode vor allem zur Früherkennung von Brustkrebs, und bei nicht regelmäßiger Durchführung ist auch die Strahlenbelastung verhältnismäßig gering.

Zusammenfassen kann gesagt werden, dass LB bereits ein sehr wichtiges Tool in der medizinischen Krebsforschung darstellt, und auch sehr große Bedeutung für die Herstellung von immunologischen Krebsmedikamenten hat. Für die Routinediagnostik und Behandlung muss jedoch noch Forschung in Form von diversen Studien betrieben werden, um eine nachweisliche Evidenz gewährleisten zu können.

Gerade bei CTCs gestaltet sich die Früherkennung anhand von LB noch schwierig, da beinahe keine zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut vorhanden sind. Dahingegen ist bekannt, dass die Mammographie bei Patient*innen mit dichtem Brustgewebe als schwieriger gilt als bei jenen mit eher lockerem Gewebe.(148) So haben verschiedene Ansätze ihre Vor- und Nachteile. Es ist durchaus vorstellbar, dass sich Methoden wie die Analyse von CTCs, ctDNA und herkömmlichen Methoden wie die Mammographie ergänzen und im besten Fall Auskunft über Tumorstatus und die Tumorerheterogenität bieten können. Die Vor- und Nachteile einzelner Methoden und Ihre Anwendung hängt stark von den individuellen Fragestellungen ab, die in der klinischen Forschung oder der Patient*innenversorgung auftreten. Durch intensive Forschung und technologisches Voranschreiten bieten diese Ansätze eine solide Grundlage für den Fortschritt in der Diagnose, Therapie und Heilung von onkologischen Erkrankungen.

Durch die minimalinvasive Analyse von ctDNA sowie anderer Biomarker besteht das Potenzial, frühzeitig Mutationen oder maligne tumorassoziierte Veränderungen zu erkennen. Die Identifizierung besagter Veränderungen, könnte es ermöglichen, präkanzeröse Läsionen oder frühe Tumorbildung zu erfassen, noch bevor sie klinisch manifest werden. Die derzeitige Forschungslage zeigt vielversprechende Ergebnisse, dennoch sind weitere umfassende Studien notwendig, um die präzise Effektivität der Liquid Biopsy für die Früherkennung von Brustkrebs zu bestätigen und die klinische Anwendbarkeit in breiteren Bevölkerungsgruppen zu untersuchen. Nichtsdestotrotz deuten vorliegende Forschungsergebnisse darauf hin, dass LB-basierte Methoden das Potenzial besitzen, die (Brust-)Krebs-Diagnostik zu

revolutionieren und die Patient*innen-Ergebnisse insbesondere in Bezug auf frühe Stadien der Erkrankung zu verbessern.(149,150)

6.2 Wann ist Liquid Biopsy sinnvoll

NGS-Analysen von ctDNA, die durch LB gewonnen wurde, sind ein vielversprechendes Tool in der Krebsfrüherkennung, jedoch stellen die sehr geringen Mengen an ctDNA bei Frühstadien der Krankheit noch eine große technische Herausforderung dar. Ist erst genug ctDNA zur Diagnose vorhanden, ist also der Tumor oft schon in einem weiteren Stadium welches schwerer zu therapieren ist. Ein weiteres Problem besteht darin, dass nicht-pathologisches, normales Gewebe, somatische Mutationen aufweisen kann, beispielsweise Zellen der hämatopoetischen Reihe wie bereits in Kapitel 6.1.1 „ctDNA“ kurz angeschnitten, die von denjenigen im Krebs nicht zu unterscheiden sind. Wie oben genannt können CH-Mutationen jedoch durch Kontrollen aus gesunden Gewebeproben, von jenen die tatsächlich pathologisch sind, unterschieden werden.(76)

Ein Faktor der mit Sicherheit für sich spricht ist jener, dass der Aufwand der betrieben werden so gering wie möglich ist. Er beschränkt sich nämlich auf eine venöse Blutabnahme. Dies ist vor allem von Vorteil, wenn die Patient*innen sich in einem schlechten Allgemeinzustand befinden, oder der Tumor an einer schwierig zu erreichenden Stelle sitzt, beispielsweise hätte man meist für diverse Lungentumore nur die Möglichkeit der Feinnadelaspiration mit welcher man sehr schwer die gewünschten Proben zu extrahieren vermag. Eine weitere sehr nützliche Eigenschaft der LB ist des Weiteren die Möglichkeit der Feststellung von frühzeitigen Hinweisen auf ein Wiederauftreten eines Tumors. Dadurch das Liquid Biopsy Messungen der Gesamt-Tumorlast auf Zeit liefern können, ist sie ebenfalls eine sehr wertvolle Methode in Bezug auf den Therapieerfolg beziehungsweise auf die Entstehung von Resistenzen gegen die eingesetzten Targeted Therapies.

In der bereits in Kapitel 4.2 erwähnten Studie von Phallen et al. in der 200 Patient*innen mit einer festgestellten Krebserkrankung im Stadium I/II sowie 44 gesunde Kontrollpersonen untersucht wurden, wiesen 134 (67%) Mutationen in

ihrer zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) auf. Bei den Patient*innen mit Stadium-I-Erkrankung wurden jedoch nur in 35 von 64 Fällen (54%) Mutationen festgestellt. Die Sensitivität war bei Patient*innen mit Darmkrebs am höchsten (83%), gefolgt von Eierstockkrebs (71%), Lungenkrebs (62%) und Brustkrebs (56%). Für Patient*innen mit Stufe I oder II der Krankheit betrug die Sensitivität 71% bei Darmkrebs, 68% bei Eierstockkrebs und 59% sowohl bei Lungen- als auch bei Brustkrebs.(105) Diese Ergebnisse stellen nun die Frage in den Raum, ob LB gerade bei Brustkrebs, wo es etablierte Methoden zur Früherkennung gibt, diese Methodik schon so weit einsetzbar ist, oder ob nicht doch etwa die Mammographie einstweilen ihren Platz als Methode der Wahl behalten sollte. Für jedoch andere tödliche Krebsarten wie Bauchspeicheldrüsen- oder Eierstockkrebs gibt es jedoch keine empfohlenen Screening-Methoden, und die Mehrheit der Patient*innen mit diesen Krebsarten wird in fortgeschrittenen Stadien mit einer schlechten Prognose diagnostiziert. Hierbei wäre die LB als Screeningmethode wiederum sinnvoll.(151) Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die LB zwar eine vielversprechende Methode zur Früherkennung darstellt, sie zum jetzigen Zeitpunkt jedoch keinesfalls die herkömmlichen Methoden (Mammographie, Ultraschall, engmaschiges Screening, etc.) zur Früherkennung von Brustkrebs ablösen kann. Bei spezifischen Fragestellungen ist es durchaus sinnvoll, sie als komplementäres Werkzeug zur Therapieüberwachung sowie zur Diagnosesicherung einzusetzen. Mit voranschreitender Forschung wird auch die LB in Zukunft immer mehr an Bedeutung in der Früherkennung von Tumorerkrankungen gewinnen.

7 Literaturverzeichnis

1. Statistik Austria. Statistic Austria Krebserkrankungen Österreich. <https://www.statistik.at/fileadmin/announcement/2022/05/20220127Krebserkrankungen2019.pdf>. 27. Jänner 2022;
2. Mag. Dr.scient.med. Monika Hackl, Petra Ihle B. Krebserkrankungen in Österreich 2020. Wien; 2020.
3. Duffy MJ, Diamandis EP, Crown J. Circulating tumor DNA (ctDNA) as a pan-cancer screening test: is it finally on the horizon? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 27. Juli 2021;59(8):1353–61.
4. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* (1979). 29. März 2013;339(6127):1546–58.
5. Fishbein L. An Overview of Some Metabolic and Modulating Factors in Toxicity and Chemical Carcinogenesis. *J Am Coll Toxicol*. 4. Jänner 1983;2(1):63–89.
6. `Warshawsky D `Landolph, JRJ. *Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer*. CRC, Taylor and Francis; 2006. 6–6 S.
7. Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, u. a. Glucose Deprivation Contributes to the Development of *KRAS* Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science* (1979). 18. September 2009;325(5947):1555–9.
8. Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Rivadeneira D, Chiavarina B, Pavlides S, Wang C, u. a. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution. *Cell Cycle*. 15. August 2010;9(16):3276–96.
9. Wagener C, Müller O. 7.2 Zellzyklus. In: Wagener C, Müller O, Herausgeber. *Molekulare Onkologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010.
10. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, u. a. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 15. Februar 2001;409(6822):860–921.
11. Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I, Forbes SA. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer*. 6. November 2018;18(11):696–705.
12. Frank TS. Hereditary Cancer Syndromes. *Arch Pathol Lab Med*. 1. Jänner 2001;125(1):85–90.
13. Adamson ED. Oncogenes in development. *Development*. 1. April 1987;99(4):449–71.

14. Orban TI. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Molecular Pathology*. 1. August 2003;56(4):191–7.
15. Constâncio V, Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. *Cells*. 5. März 2020;9(3):624.
16. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet*. 16. August 2002;111(2):115–27.
17. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. Juni 2002;3(6):415–28.
18. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 11. Jänner 2013;38(1):23–38.
19. Niedernhofer LJ, Gurkar AU, Wang Y, Vijg J, Hoeijmakers JHJ, Robbins PD. Nuclear Genomic Instability and Aging. *Annu Rev Biochem*. 20. Juni 2018;87(1):295–322.
20. Soares E, Zhou H. Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 4. April 2018;75(7):1179–90.
21. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, u. a. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res*. 15. September 2008;25(9):2097–116.
22. Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer*. Juli 2004;4(7):519–27.
23. Park CS, Park HY, Jung JH, Kim WW, Chae YS, Lee SJ, u. a. Comparison of clinical features and oncologic outcomes between familial non-hereditary and hereditary breast cancer in Korean female patients. *Asian J Surg*. Oktober 2020;43(10):996–1001.
24. Tait RC, Zoberi K, Ferguson M, Levenhagen K, Luebbert RA, Rowland K, u. a. Persistent Post-Mastectomy Pain: Risk Factors and Current Approaches to Treatment. *J Pain*. Dezember 2018;19(12):1367–83.
25. Singer CF, Tea MK, Pristauz G, Hubalek M, Rappaport C, Riedl CC, u. a. Clinical Practice Guideline for the prevention and early detection of breast and ovarian cancer in women from HBOC (hereditary breast and ovarian cancer) families. *Wien Klin Wochenschr*. 2. Dezember 2015;127(23–24):981–6.
26. Renzulli M, Zanotti S, Clemente A, Mineo G, Tovoli F, Reginelli A, u. a. Hereditary breast cancer: screening and risk reducing surgery. *Gland Surg*. September 2019;8(S3):S142–9.

27. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, u. a. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* August 2008;9(8):730–56.
28. Lee EYHP, Muller WJ. *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 1. Oktober 2010;2(10):a003236–a003236.
29. National Cancer Institute. U.S. Department of Health and Human Services. 2023. *Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes.*
30. Tan EM. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Their Immunobiology and Medicine. In 1982. S. 167–240.
31. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 15. Jänner 1983;31(1):13–20.
32. Oeffinger KC, Fontham ETH, Etzioni R, Herzig A, Michaelson JS, Shih YCT, u. a. Breast Cancer Screening for Women at Average Risk. *JAMA.* 20. Oktober 2015;314(15):1599.
33. Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 9. März 2020;50(3):225–9.
34. Gao Q, Zeng Q, Wang Z, Li C, Xu Y, Cui P, u. a. Circulating cell-free DNA for cancer early detection. *The Innovation.* Juli 2022;3(4):100259.
35. Bretthauer M, Kalager M. Principles, effectiveness and caveats in screening for cancer. *British Journal of Surgery.* 5. Dezember 2012;100(1):55–65.
36. sozialministerium.at. Bundesministerium. 2022. *Brustkrebs-Früherkennungsprogramm.*
37. Esserman LJ, Thompson IM, Reid B, Nelson P, Ransohoff DF, Welch HG, u. a. Addressing overdiagnosis and overtreatment in cancer: a prescription for change. *Lancet Oncol.* Mai 2014;15(6):e234–42.
38. Jørgensen KJ, Keen JD, Gøtzsche PC. Is Mammographic Screening Justifiable Considering Its Substantial Overdiagnosis Rate and Minor Effect on Mortality? *Radiology.* September 2011;260(3):621–7.
39. Nelson HD. Screening for Breast Cancer: An Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 17. November 2009;151(10):727.
40. Gøtzsche PC, Jørgensen KJ. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 4. Juni 2013;2013(6).
41. Zubor P, Kubatka P, Kajo K, Dankova Z, Polacek H, Bielik T, u. a. Why the Gold Standard Approach by Mammography Demands Extension by Multiomics? Application of Liquid Biopsy miRNA Profiles to Breast Cancer Disease Management. *Int J Mol Sci.* 13. Juni 2019;20(12):2878.

42. Malati T. Tumour markers: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. September 2007;22(2):17–31.
43. Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Muñoz M, u. a. c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer: prognostic value. *Breast Cancer Res Treat*. September 1998;51(2):109–19.
44. Yang Y, Zhang H, Zhang M, Meng Q, Cai L, Zhang Q. Elevation of serum CEA and CA15-3 levels during antitumor therapy predicts poor therapeutic response in advanced breast cancer patients. *Oncol Lett*. 10. Oktober 2017;
45. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*. 8. Februar 2019;20(2):71–88.
46. J R Coll Gen Pract. Principles and practice of screening for disease. 1968 Okt.
47. Stratton MR. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. *Science* (1979). 25. März 2011;331(6024):1553–8.
48. Freitas AJA de, Causin RL, Varuzza MB, Hidalgo Filho CMT, Silva VD da, Souza C de P, u. a. Molecular Biomarkers Predict Pathological Complete Response of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients: Review. *Cancers (Basel)*. 31. Oktober 2021;13(21):5477.
49. Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, u. a. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 18. April 2012;2021(2).
50. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185 *HER2* Monoclonal Antibody Has Antiproliferative Effects In Vitro and Sensitizes Human Breast Tumor Cells to Tumor Necrosis Factor. *Mol Cell Biol*. 1. März 1989;9(3):1165–72.
51. Dubská L, Anděra L, Sheard MA. HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: An unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 1. August 2005;579(19):4149–58.
52. Tan CRC, Zhou L, El-Deiry WS. Circulating Tumor Cells Versus Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer: Pros and Cons. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 7. Juni 2016;12(3):151–61.
53. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 12. September 2022;15(1):131.
54. Kim Y, Jeon J, Mejia S, Yao CQ, Ignatchenko V, Nyalwidhe JO, u. a. Targeted proteomics identifies liquid-biopsy signatures for extracapsular prostate cancer. *Nat Commun*. 28. Juni 2016;7(1):11906.

55. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci.* März 2019;40(3):172–86.
56. MANDEL P, METAIS P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil.* Februar 1948;142(3–4):241–3.
57. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* März 1977;37(3):646–50.
58. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:190–5.
59. Zhang W, Xia W, Lv Z, Ni C, Xin Y, Yang L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;41(2):755–68.
60. Wong FCK, Sun K, Jiang P, Cheng YKY, Chan KCA, Leung TY, u. a. Cell-free DNA in maternal plasma and serum: A comparison of quantity, quality and tissue origin using genomic and epigenomic approaches. *Clin Biochem.* Dezember 2016;49(18):1379–86.
61. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, u. a. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun.* 29. November 2018;9(1):5068.
62. Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opin Biol Ther.* 18. Mai 2012;12(sup1):S209–15.
63. Lam WKJ, Gai W, Sun K, Wong RSM, Chan RWY, Jiang P, u. a. DNA of Erythroid Origin Is Present in Human Plasma and Informs the Types of Anemia. *Clin Chem.* 1. Oktober 2017;63(10):1614–23.
64. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, u. a. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Journal of Clinical Oncology.* 1. Juni 2018;36(16):1631–41.
65. Zhu Y juan, Zhang H bo, Liu Y hong, Zhang F li, Zhu Y zhen, Li Y, u. a. Quantitative cell-free circulating EGFR mutation concentration is correlated with tumor burden in advanced NSCLC patients. *Lung Cancer.* Juli 2017;109:124–7.
66. Burnham P, Khush K, De Vlaminck I. Myriad Applications of Circulating Cell-Free DNA in Precision Organ Transplant Monitoring. *Ann Am Thorac Soc.* September 2017;14(Supplement_3):S237–41.

67. Wilson IJ, Burchell RK, Worth AJ, Burton SE, Gedye KR, Clark KJ, u. a. Kinetics of Plasma Cell-Free DNA and Creatine Kinase in a Canine Model of Tissue Injury. *J Vet Intern Med.* Jänner 2018;32(1):157–64.
68. O’Connell GC, Petrone AB, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR, u. a. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Brain Inj.* 24. August 2017;31(10):1369–75.
69. Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keserű J, u. a. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 17. September 2020;21(18):6827.
70. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews.* 8. September 2016;35(3):347–76.
71. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 12. Juni 2011;11(6):426–37.
72. Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. In 2019. S. 3–12.
73. Benjamin Solomon MD. National Human Genome Research Institute. 2023. Cell-free DNA Testing.
74. Moulriere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, u. a. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med.* 7. November 2018;10(466).
75. Chen K, Zhao H, Shi Y, Yang F, Wang LT, Kang G, u. a. Perioperative Dynamic Changes in Circulating Tumor DNA in Patients with Lung Cancer (DYNAMIC). *Clinical Cancer Research.* 1. Dezember 2019;25(23):7058–67.
76. Adashek JJ, Janku F, Kurzrock R. Signed in Blood: Circulating Tumor DNA in Cancer Diagnosis, Treatment and Screening. *Cancers (Basel).* 18. Juli 2021;13(14):3600.
77. O’Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Fribbens C, Huang X, u. a. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun.* 1. März 2018;9(1):896.
78. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LWMM. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol.* März 2016;10(3):395–407.
79. Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, u. a. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci Transl Med.* 7. Oktober 2015;7(308).
80. Adashek JJ, Janku F, Kurzrock R. Signed in Blood: Circulating Tumor DNA in Cancer Diagnosis, Treatment and Screening. *Cancers (Basel).* 18. Juli 2021;13(14):3600.

81. Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Circulating Tumor Cells. *Science* (1979). 13. September 2013;341(6151):1186–8.
82. Sefrioui D, Blanchard F, Toure E, Basile P, Beaussire L, Dolfus C, u. a. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *Br J Cancer*. 3. September 2017;117(7):1017–25.
83. Ignatiadis M, Rack B, Rothé F, Riethdorf S, Decraene C, Bonnefoi H, u. a. Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial. *Eur J Cancer*. August 2016;63:97–104.
84. Chimonidou M, Strati A, Tzitzira A, Sotiropoulou G, Malamos N, Georgoulas V, u. a. DNA Methylation of Tumor Suppressor and Metastasis Suppressor Genes in Circulating Tumor Cells. *Clin Chem*. 1. August 2011;57(8):1169–77.
85. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, u. a. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 16. August 2017;9(403).
86. Dianat-Moghadam H, Mahari A, Heidarifard M, Parnianfard N, Pourmousavi-Kh L, Rahbarghazi R, u. a. NK cells-directed therapies target circulating tumor cells and metastasis. *Cancer Lett*. Jänner 2021;497:41–53.
87. Li W, Liu JB, Hou LK, Yu F, Zhang J, Wu W, u. a. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*. 20. Dezember 2022;21(1):25.
88. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, u. a. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*. Dezember 2009;19(22):1875–85.
89. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, u. a. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*. Dezember 2009;19(22):1875–85.
90. Kalluri R, LeBleu VS. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science* (1979). 7. Februar 2020;367(6478).
91. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. August 2002;2(8):569–79.
92. Reiners KS, Dassler-Plenker J, Coch C, Hartmann G. Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin*. 20. Dezember 2017;41(6):299–308.
93. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2. September 2017;14(9):531–48.
94. Stewart CA, Gay CM, Xi Y, Sivajothi S, Sivakamasundari V, Fujimoto J, u. a. Single-cell analyses reveal increased intratumoral heterogeneity after the

- onset of therapy resistance in small-cell lung cancer. *Nat Cancer*. 17. Februar 2020;1(4):423–36.
95. Garcia J, Kamps-Hughes N, Geiguer F, Couraud S, Sarver B, Payen L, u. a. Sensitivity, specificity, and accuracy of a liquid biopsy approach utilizing molecular amplification pools. *Sci Rep*. 24. Mai 2021;11(1):10761.
 96. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, Goyal L, Levovitz C, Siravegna G, u. a. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med*. 9. September 2019;25(9):1415–21.
 97. Eiben B, Glaubitz R, Schütz E, Beck J, Eiben C, Teubert A, u. a. Die Untersuchung zellfreier DNA durch Liquid Biopsy in der Medizin. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*. 15. Juni 2019;51(02):60–4.
 98. Lehmann U, Bartels S. Liquid Biopsy in der Tumordiagnostik. *Pathologe*. 2. Mai 2019;40(3):250–5.
 99. Song L, Li Y. SEPT9. In 2015. S. 171–204.
 100. Morris VK, Strickler JH. Use of Circulating Cell-Free DNA to Guide Precision Medicine in Patients with Colorectal Cancer. *Annu Rev Med*. 27. Jänner 2021;72(1):399–413.
 101. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2. Mai 2020;21(9):3233.
 102. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, u. a. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 25. Mai 2017;545(7655):446–51.
 103. Ruiz-Bañobre J, Rodriguez-Casanova A, Costa-Fraga N, Bao-Caamano A, Alvarez-Castro A, Carreras-Presas M, u. a. Noninvasive early detection of colorectal cancer by hypermethylation of the LINC00473 promoter in plasma cell-free DNA. *Clin Epigenetics*. 9. Dezember 2022;14(1):86.
 104. Banyś-Paluchowski M, Fehm TN, Grimm-Glang D, Rody A, Krawczyk N. Liquid Biopsy in Metastatic Breast Cancer: Current Role of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Oncol Res Treat*. 1. Februar 2022;45(1–2):4–11.
 105. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, u. a. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 16. August 2017;9(403).
 106. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, u. a. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 31. September 2008;14(9):985–90.
 107. Ding SC, Lo YMD. Cell-Free DNA Fragmentomics in Liquid Biopsy. *Diagnostics*. 13. April 2022;12(4):978.

108. Mathios D, Johansen JS, Cristiano S, Medina JE, Phallen J, Larsen KR, u. a. Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes. *Nat Commun.* 20. August 2021;12(1):5060.
109. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, u. a. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 29. Juni 2019;570(7761):385–9.
110. Yu SCY, Chan KCA, Zheng YWL, Jiang P, Liao GJW, Sun H, u. a. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 10. Juni 2014;111(23):8583–8.
111. Chan KCA, Jiang P, Sun K, Cheng YKY, Tong YK, Cheng SH, u. a. Second generation noninvasive fetal genome analysis reveals de novo mutations, single-base parental inheritance, and preferred DNA ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 13. Dezember 2016;113(50).
112. Chan KCA, Jiang P, Sun K, Cheng YKY, Tong YK, Cheng SH, u. a. Second generation noninvasive fetal genome analysis reveals de novo mutations, single-base parental inheritance, and preferred DNA ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 13. Dezember 2016;113(50).
113. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* Jänner 2016;164(1–2):57–68.
114. Ding SC, Lo YMD. Cell-Free DNA Fragmentomics in Liquid Biopsy. *Diagnostics.* 13. April 2022;12(4):978.
115. Hyun KA, Koo GB, Han H, Sohn J, Choi W, Kim SI, u. a. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget.* 26. April 2016;7(17):24677–87.
116. Li W, Zhou XJ. Methylation extends the reach of liquid biopsy in cancer detection. *Nat Rev Clin Oncol.* 30. November 2020;17(11):655–6.
117. Kang S, Li Q, Chen Q, Zhou Y, Park S, Lee G, u. a. CancerLocator: non-invasive cancer diagnosis and tissue-of-origin prediction using methylation profiles of cell-free DNA. *Genome Biol.* 24. Dezember 2017;18(1):53.
118. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* Jänner 2002;196(1):1–7.
119. Untch M, Fasching PA, Haidinger R, Harbeck N, Jackisch C, Lüftner D, u. a. Advanced Breast Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 30. Oktober 2022;82(10):1044–54.
120. Barratt A. Cancer screening. *J Epidemiol Community Health (1978).* 1. Dezember 2002;56(12):899–902.

121. Wu HJ, Chu PY. Current and Developing Liquid Biopsy Techniques for Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 19. April 2022;14(9):2052.
122. Tangvarasittichai O, Jaiwang W, Tangvarasittichai S. The Plasma DNA Concentration as a Potential Breast Cancer Screening Marker. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 22. Jänner 2015;30(1):55–8.
123. Donaldson J, Park BH. Circulating Tumor DNA: Measurement and Clinical Utility. *Annu Rev Med*. 29. Jänner 2018;69(1):223–34.
124. Millner LM, Linder MW, Valdes R. Circulating tumor cells: a review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. *Ann Clin Lab Sci*. 2013;43(3):295–304.
125. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, u. a. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 16. August 2017;9(403).
126. Duffy MJ, Diamandis EP, Crown J. Circulating tumor DNA (ctDNA) as a pan-cancer screening test: is it finally on the horizon? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 27. Juli 2021;59(8):1353–61.
127. Dahl E, Jung A, Fassunke J, Hummel M, Penzel R, Dietmaier W, u. a. Chancen und Risiken der blutbasierten molekularpathologischen Analytik zirkulierender Tumorzellen (CTC) und zellfreier DNA (cfDNA) in der personalisierten Krebstherapie. *Pathologe*. 24. Februar 2015;36(1):92–7.
128. Glasziou PP, Jones MA, Pathirana T, Barratt AL, Bell KJ. Estimating the magnitude of cancer overdiagnosis in Australia. *Medical Journal of Australia*. 19. März 2020;212(4):163–8.
129. van der Poort EKJ, van Ravesteyn NT, van den Broek JJ, de Koning HJ. The Early Detection of Breast Cancer Using Liquid Biopsies: Model Estimates of the Benefits, Harms, and Costs. *Cancers (Basel)*. 15. Juni 2022;14(12):2951.
130. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res*. 1. April 1994;54(7):1634–7.
131. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, u. a. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science (1979)*. 23. Februar 2018;359(6378):926–30.
132. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. September 2016;8(9):a019505.
133. Dong L, Ren H. Blood-based DNA Methylation Biomarkers for Early Detection of Colorectal Cancer. *J Proteomics Bioinform*. 2018;11(6).
134. Leal A, Sidransky D, Brait M. Tissue and Cell-Free DNA-Based Epigenomic Approaches for Cancer Detection. *Clin Chem*. 1. Jänner 2020;66(1):105–16.

135. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV, Liu MC, u. a. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Annals of Oncology*. Juni 2020;31(6):745–59.
136. Newman AM, Bratman S V, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, u. a. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 6. Mai 2014;20(5):548–54.
137. Suter MB, Pesapane F, Agazzi GM, Gagliardi T, Nigro O, Bozzini A, u. a. Diagnostic accuracy of contrast-enhanced spectral mammography for breast lesions: A systematic review and meta-analysis. *The Breast*. Oktober 2020;53:8–17.
138. Stout NK, Lee SJ, Schechter CB, Kerlikowske K, Alagoz O, Berry D, u. a. Benefits, Harms, and Costs for Breast Cancer Screening After US Implementation of Digital Mammography. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. Juni 2014;106(6).
139. Lehman CD, Arao RF, Sprague BL, Lee JM, Buist DSM, Kerlikowske K, u. a. National Performance Benchmarks for Modern Screening Digital Mammography: Update from the Breast Cancer Surveillance Consortium. *Radiology*. April 2017;283(1):49–58.
140. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Bianchini F, u. a. Breast-Cancer Screening — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*. 11. Juni 2015;372(24):2353–8.
141. Mandelblatt JS, Stout NK, Schechter CB, van den Broek JJ, Miglioretti DL, Krapcho M, u. a. Collaborative Modeling of the Benefits and Harms Associated With Different U.S. Breast Cancer Screening Strategies. *Ann Intern Med*. 16. Februar 2016;164(4):215.
142. Tan SYGL, van Oortmarsen GJ, de Koning HJ, Boer R, Habbema JDF. Chapter 9: The MISCAN-Fadia Continuous Tumor Growth Model for Breast Cancer. *JNCI Monographs*. 1. Oktober 2006;2006(36):56–65.
143. van den Broek JJ, van Ravesteyn NT, Heijnsdijk EA, de Koning HJ. Simulating the Impact of Risk-Based Screening and Treatment on Breast Cancer Outcomes with MISCAN-Fadia. *Medical Decision Making*. 19. April 2018;38(1_suppl):54S-65S.
144. Jacobs AT, Martinez Castaneda-Cruz D, Rose MM, Connelly L. Targeted therapy for breast cancer: An overview of drug classes and outcomes. *Biochem Pharmacol*. Oktober 2022;204:115209.
145. Hofman P, Heeke S, Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy in the era of immuno-oncology: is it ready for prime-time use for cancer patients? *Annals of Oncology*. September 2019;30(9):1448–59.

146. Turner NC, Kingston B, Kilburn LS, Kernaghan S, Wardley AM, Macpherson IR, u. a. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. *Lancet Oncol.* Oktober 2020;21(10):1296–308.
147. Pons-Belda OD, Fernandez-Uriarte A, Diamandis EP. Multi Cancer Early Detection by Using Circulating Tumor DNA—The Galleri Test. Reply to Klein et al. The Promise of Multicancer Early Detection. Comment on “Pons-Belda et al. Can Circulating Tumor DNA Support a Successful Screening Test for Early Cancer Detection? The Grail Paradigm. *Diagnostics* 2021, 11, 2171”. *Diagnostics.* 17. Mai 2022;12(5):1244.
148. Zubor P, Kubatka P, Kajo K, Dankova Z, Polacek H, Bielik T, u. a. Why the Gold Standard Approach by Mammography Demands Extension by Multiomics? Application of Liquid Biopsy miRNA Profiles to Breast Cancer Disease Management. *Int J Mol Sci.* 13. Juni 2019;20(12):2878.
149. Addanki S, Meas S, Sarli VN, Singh B, Lucci A. Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Precision Oncology for Breast Cancers. *Int J Mol Sci.* 16. Juli 2022;23(14):7843.
150. Magbanua MJM, Gumusay O, Kurzrock R, van 't Veer LJ, Rugo HS. Immunotherapy in Breast Cancer and the Potential Role of Liquid Biopsy. *Front Oncol.* 15. März 2022;12.
151. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, u. a. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* Juli 2016;66(4):271–89.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Karzinogenese, Quelle: Sarkar et al. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. doi: 10.3390/ijms141021087	4
Abbildung 2: Vergleich von LB und Gewebebiopsie,Quelle: Lone et al. doi:https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7	16
Abbildung 3: Liquid Biopsy als Anwendung zur Identifizierung von frühen Stadien verschiedener Tumorerkrankungen im Vergleich zu herkömmlichen Methoden, Quelle: Gao et al. Circulating cell-free DNA for cancer early detection, https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100259	28

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht von Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher LB-basierter Screeningmethoden.....	
.....	34