Flüssigbiopsie: Status quo und Zukunftsperspektiven

Klaus Pantel Sonja Mader

Institut für Tumorbioogie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Schlüsselwörter

Flüssigbiopsie · Zirkulierende Tumorzellen (CTC) · ctDNA · cfRNA · Exosome

Zusammenfassung

Krebspatienten erhalten gewöhnlich eine auf die molekularen Eigenschaften des Primärtumors ausgerichtete Behandlung. Diese Merkmale können sich im Verlauf der molekularen Entwicklung von Fernmetastasen, welche die Hauptursache krebserkrankter Todesfälle sind, verändern. Das Primärtumorgewebe liefert, sofern es überhaupt für die Gewinnung einer Gewebeprobe zugänglich ist, nicht immer ausreichend Informationen, um die einzelnen Patienten stratifizieren und sie der Therapie zuführen zu können, die für sie am besten geeignet ist. Eine wiederholte Beurteilung metastatischer Läsionen mittels Nadelbiopsie ist möglich, jedoch invasiv und durch die bekannte Intra-Patienten-Heterogenität der einzelnen Läsionen limitiert. Diese Hindernisse können durch die Analyse

von Tumorzellen oder Tumorzellprodukten in einer Blutprobe (Flüssigbiopsie) überwunden werden, da diese im Prinzip alle zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden Subklone widerspiegelt und eine sequenzielle Kontrolle des Krankheitsverlaufs ermöglicht. Flüssigbiopsien geben Auskunft über zirkulierende Tumorzellen sowie vom Tumor freigesetzte zellfreie Nukleinsäuren, Exosome und Thrombozyten. In der vorliegenden Arbeit stellen wir die verschiedenen Ansätze im Zusammenhang mit blutbasierten Flüssigbiopsien vor und erörtern die klinische Anwendung in der Onkologie.

© 2017 S. Karger GmbH, Freiburg

Einleitung

Die Flüssigbiopsie ist die Vision, den Krankheitsverlauf eines Krebspatienten jederzeit anhand einer einfachen Blutprobe überwachen zu können. Doch wird diese Vision in naher Zukunft auch für die Routine-Patientenversorgung Realität werden? Das Konzept der Flüssigbiopsie ist nicht auf die Onkologie begrenzt, sondern lässt sich auch in der pränatalen Diagnostik [1], bei kardiovaskulären Erkrankungen [2] oder Atherosklerose anwenden [3]. In der Onkologie beinhaltet die Flüssigbiopsie von Blutproben intakte Zellen, zellfreie Nukleinsäuren oder andere Komponenten wie beispielsweise Exosome, die von Tumoren und/oder metastatischen Absiedlungen freigesetzt werden [4] (Abb. 1).

Große Anstrengungen werden unternommen, um neue Verfahren zu entwickeln und geeignete Biomarker für ein breites Spektrum an bösartigen Erkrankungen zu finden. Trotz enormer Fortschritte in den letzten Jahren werden Flüssigbiopsien bislang selten im Rahmen der Routineuntersuchungen von Patienten eingesetzt [5]. Zudem fehlen validierte Therapieleitlinien für das Vorgehen, nachdem das Ergebnis vorliegt. Die technischen Fortschritte und die ermutigenden Ergebnisse klinischer Studien sprechen jedoch dafür, dass die Flüssigbiopsie die Krebsdiagnostik in Zukunft revolutionieren wird.

Abb. 1. Flüssigbiopsien liefern eine Vielzahl klinisch wichtiger Informationen. Die Blutproben können auf zirkulierende Tumorzellen (CTC), zellfreie Nukleinsäuren, Exosome und sogenannte tumor-educated platelets (TEP) untersucht werden, die alle wertvolle molekulare Informationen auf der Genom-, Transkriptom- und/oder Proteom-Ebene enthalten.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Vorteile und Herausforderungen der Flüssigbiopsie in der Onkologie und erörtern, welches Potenzial zirkulierende Tumorzellen sowie vom Tumor freigesetzte zellfreie Nukleinsäuren, Exosome und Thrombozyten bergen.

Flüssigbiopsien in der Onkologie: die Vision

Gewebebiopsien werden normalerweise aus dem Primärtumor entnommen und spiegeln dessen molekularen Aufbau zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme wider. Da Tumoren zu Heterogenität neigen, besteht das Risiko, dass einige Merkmale, womöglich gerade die aggressivsten Subklone, unentdeckt bleiben, sodass wertvolle Informationen, die z.B. für die Therapieentscheidung wichtig sind, unerkannt bleiben. Demgegenüber spiegelt eine Biopsie, die aus dem Blut entnommen wird, ein breites Spektrum an Tumormerkmalen wider, darunter auch solche etwaiger Metastasen und biochemischer Veränderungen, die während der Streuung über den Blutkreislauf entstanden sind und die nicht im Primärtumor vorliegen. Die Intra-Patienten-Heterogenität der Tumormerkmale [6] spiegelt sich daher in einer einzelnen Blutprobe wider [7]. Auf diese Weise können neu erworbene molekulare oder genomische Veränderungen sekundärer Läsionen identifiziert und bekämpft werden, noch bevor eine Metastasierung nachweisbar ist. Hinzu kommt, dass manche Tumoren aufgrund ihrer speziellen Lage im Körper nicht für die Nadelbiopsie zugänglich sind. Dank der geringen Invasivität und des geringen Risikos von Flüssigbiopsien können jederzeit und wiederholt Proben entnommen werden, wenn dies erforderlich ist, um die dynamischen molekularen Veränderungen der Erkrankung zu überwachen, die besonders durch den selektiven Druck der medikamentösen Therapie beeinflusst wird [8]. Ein weiterer Vorteil ist der geringe Zeit- und Kostenaufwand der Probengewinnung.

Zirkulierende Tumorzellen

Zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells, CTC) wurden erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts von dem australischen Pathologen Ashworth beschrieben, der im Blut eines Patienten nach dessen Tod Zellen entdeckt hatte, die denen des Tumors gleichen [9]. Bis heute wurden zahlreiche Studien zu CTC und ihrer klinischen Relevanz veröffentlicht und es hat sich ein breites wissenschaftliches Feld zu diesem Thema entwickelt [10]. CTC sind besonders deshalb interessant, weil es diesen Zellen gelungen ist, sich vom Tumor zu lösen und in den Blutkreislauf zu gelangen und weil sie potenziell in entfernte Gewebe eindringen und manifeste Metastasen bilden können. Eine eingehende Untersuchung dieser Metastasen-initiiierenden Zellen [11] kann dazu beitragen, die molekularen Prozesse der metastatischen Kaskade zu entschlüsseln [12]. Entscheidend dafür, dass eine Zelle ins Gefäß eindringen und in der Blutbahn überleben kann, ist, dass sie Plastizität und Motilität erwirbt, ein Prozess, der als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird. Im Verlauf der EMT kann das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) herunterreguliert werden. Da es häufig als Marker zur Anreicherung von CTC eingesetzt wird, werden Verfahren benötigt, die auch die mesenchymale Fraktion der CTC genau erfassen können. Verschiedene Ansätze, dieses Problem aufzugreifen, wurden verfolgt und einige von ihnen bereits in ersten klinischen Studien untersucht [13].

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Verfahren zur Analyse von CTC im Blut entwickelt, die an anderer Stelle erörtert werden [14]. Die Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen können in der Onkologie sehr unterschiedlichen Zielen dienen. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass CTC-Positivität ein prognostischer Marker für das Outcome bei verschiedenen Karzinomen ist und dadurch die Identifizierung von Patienten mit minimaler Resterkrankung ermöglicht wird, bei denen das Risiko eines Rezidivs besteht [15–17]. Darüber hinaus können CTC-Analysen als Orientierungshilfe bei Therapieentscheidungen dienen, da sie als Prädiktor für das Ansprechen eines Patienten auf pharmazeutische Wirkstoffe gemäß der spezifischen molekularen Signatur seiner Krankheit herangezogen werden können wie beispielsweise die Expression der Androgenrezeptorvariante V7 (AR-V7) beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom (CRPC) [18]. Während der Therapie kann die Detektion von CTC als Surrogat-Marker für das Ansprechen z.B. bei CRPC [19] und Brustkrebs dienen [20]. Interessanterweise fanden Yu und Kollegen [21] bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs eine dynamische Dominanz von entweder epithelialen CTC in Remissionsphasen oder mesenchymal-artigen CTC in Phasen mit progredienter Erkrankung. Außerdem beobachteten sie CTC-Cluster. Aus wissenschaftlicher Sicht sind eingehende Untersuchungen der CTC-Merkmale auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene interessant, da sie helfen, die Biologie des Metastasierungsprozesses zu verstehen und die zugrunde liegenden Mechanismen bei Therapieresistenz zu entschlüsseln. Eine hohe Zellzahl erleichtert die Durchführung funktioneller Untersuchungen.

Bisher wurden erfolgreich CTC-Zelllinien beispielsweise von Darm- [22] und Brustkrebspatienten [23] sowie CTC-Xenografts von Brustkrebs- und Lungenkrebspatienten [11, 24, 25] etabliert, die für *In-vitro*- und *In-vivo*-Arzneimitteluntersuchungen verwendet werden können.

Zirkulierende zellfreie Nukleinsäuren

Es ist bekannt, dass apoptotische und nekrotische Tumorzellen zellfreie Nukleinsäurefragmente (cfDNA, cfRNA und cfmiRNA) in die Blutbahn von Krebspatienten freisetzen. Darüber hinaus wurde eine aktive Sekretion von cfDNA in Exosomen sowie eine Freisetzung verdauter Fragmente durch Makrophagen nach Phagozytose apoptotischer und nekrotischer Zellen diskutiert [26]. Man nimmt an, dass der überwiegende Teil der zirkulierenden DNA aus nicht-malignen Zellen stammt, doch wurde im Blut von Patienten mit Krebs im fortgeschrittenen Stadium eine erhöhte Konzentration an cfDNA festgestellt [27]. Eine spezifische Isolierung der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) aus dem Pool der gesamten cfDNA ist nicht möglich, allerdings deutet der Nachweis von tumorspezifischen Mutationen auf ihr Vorhandensein hin [5]. Neben dem Primärtumor können potenziell auch mikrometastatische Absiedlungen oder CTC zur Freisetzung von ctDNA beitragen, sodass diese alle bei einem Patienten vorliegenden Subklone widerspiegelt [26].

Im Allgemeinen kann cfDNA aus dem Plasma mithilfe von zielgerichteten oder nicht zielgerichteten Methoden analysiert werden, die an anderer Stelle erörtert werden [28, 29]. Zielgerichtete Methoden dienen der Detektion bekannter genetischer Veränderungen, wie etwa therapeutisch relevanter (druggable) Mutationen, die Auswirkungen auf die Therapieentscheidungen haben [30].

Interessanterweise wies die Studie von Murtaza und Kollegen [31], in der die klonale Entwicklung bei sechs Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung über ein bis zwei Jahre verfolgt wurde, die Entstehung einer sekundären Arzneimittelresistenz im Verlauf der Krankheit nach. Douillard et al. [32] zeigten, dass cfDNA bei der Bestimmung des EGFR (epidermal growth factor receptor)-Mutationsstatus bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs von klinischem Nutzen ist und als Ersatz verwendet werden kann, wenn Gewebebiopsien nicht verfügbar sind. Die Detektion von EGFR-Genmutationen in cfDNA mithilfe des Cobas EGFR Mutation Test v2 erhielt 2016 die Zulassung durch die FDA als therapiebegleitende Diagnostik (companion diagnostic) für Erlotinib. Damit ist dies der erste blutbasierte Biopsietest, der für die Anwendung bei klinischen Entscheidungen zulassen wurde [33].

Aufgrund der niedrigeren Sensitivität von ctDNA-Analysen ist die Analyse des Primärtumors weiterhin der Goldstandard in der NSCLC-Diagnostik von EGFR- (und anderen) Mutationen. Empfehlungen zufolge (z.B. seitens der FDA) sollte jedoch zunächst das Blut untersucht werden, um die Anzahl invasiver Biopsien bei Krebspatienten möglichst gering zu halten. Da cfRNA im Blut weniger stabil ist als cfDNA, wenn sie nicht in schützenden Vesikeln enthalten ist [26], existieren nur wenige Verfahren zur Ana-

lyse von cfRNA im Rahmen einer Flüssigbiopsie. Qin et al. [34] versuchten, cfRNA zu stabilisieren, indem sie neuartige Blutprobenröhrchen verwendeten. Die klinische Bedeutung von cfRNA wurde von der Gruppe um Pucciarelli [35] untersucht, die eine signifikante Vorhersagbarkeit des Ansprechens auf eine präoperative Radiochemotherapie (preoperative chemoradiotherapy, pCRT) bei Patienten mit Rektumkarzinom mittels RT-PCR zeigten. In einer Mikroarray-basierten Studie mit CRPC-Patienten korrelierte eine 9-Gene-Signatur signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben [36].

MicroRNA (miRNA, miR-x) hängen ebenfalls eng mit der Pathogenese der meisten malignen Erkrankungen beim Menschen zusammen [37] und zirkulierende zellfreie miRNA (cfmiRNA) wurden als neuer Marker für die Flüssigbiopsie in der Onkologie etabliert [38]. Die aus etwa 22 Nukleotiden bestehenden cfmiRNA sind im Blut stabiler als cfRNA und, aufgrund der Bindung der meisten cfmiRNA an Argonaut-2 (AGO2)-Komplexe, wahrscheinlich resistent gegenüber der endogenen RNase-Aktivität [39]. Zu den drei wichtigsten Detektionsverfahren im Anschluss an die RNA-Extraktion gehören die quantitative RT-PCR, Mikroarray-Analysen und Deep Sequencing [38]. Die Verwendung von cfmiRNA wurde zur Therapieüberwachung und Vorhersage des Ansprechens vorgeschlagen, wie von Schwarzenbach und Kollegen beschrieben [38].

Exosome und Tumor-Educated Platelets

Eine Herausforderung bei der Analyse zirkulierender zellfreier Nukleinsäuren ist ihre Instabilität im Blut. Von Tumor- wie auch von normalen Zellen ist außerdem bekannt, dass sie zelluläre Inhaltsstoffe ins Blut abgeben, indem sie Mikrovesikel wie Exosome (40–150 nm) freisetzen. Wegen ihrer protektiven Umgebung sind Exosome eine wertvolle Quelle für die Analyse der darin enthaltenen Proteine, DNA, RNA, miRNA, Lipide und Metaboliten [40]. Exosome können mittels Ultrazentrifugation, Separation entsprechend der Dichte oder mithilfe von magnetischen Kügelchen isoliert werden, an die anti-EpCAM-Antikörper gekoppelt sind [41]. Hoshino et al. [42] zeigten, dass die Zusammensetzung der exosomal Integrität ein Prädiktor für die organspezifische Metastasierung ist und dass aus dem Tumor stammende Exosome die prämetastatische Nische vorbereiten. Entsprechend können Melanom-Exosome Knochenmarksvorläuferzellen zur Ausbildung eines prometastatischen Phänotyps beeinflussen, wie von Peinado und Kollegen nachgewiesen [43].

Eine weitere neue Klasse von Komponenten für die Flüssigbiopsie sind TEPs (tumor-educated platelets, Thrombozyten) [44]. Diese kernlosen Zellfragmente sind der zweithäufigste Zelltyp im peripheren Blut und können von Tumorzellen durch den Transfer Tumor-assoziierten Biomoleküle, hauptsächlich RNA, geprägt werden. Die Isolierung der Thrombozyten erfolgt durch Zentrifugation und die RNA kann für RT-PCR-Analysen genutzt werden [45]. Best und Kollegen [46] zeigten mittels mRNA-Sequenzierung von TEPs, dass Patienten mit unterschiedlichen Krebsentitäten mit einer Genauigkeit von 96% von gesunden Probanden

unterschieden werden konnten und dass die Lokalisation des Primärtumors mit einer Präzision von 71% korrekt ermittelt werden konnte. Darüber hinaus wurden Biomarker (MET- oder HER2-Expression / KRAS-, EGFR- und PIK3CA-Mutationen) in Surrogat-TEP-mRNA-Profilen identifiziert, die in zukünftigen Studien als potenzielle Prädiktoren für gezielte Therapien untersucht werden können.

Schlussfolgerungen und Zukunftsperspektiven

Die Flüssigbiopsie hat sich zu einem sehr aktiven Forschungsfeld entwickelt und insbesondere CTC und cfDNA haben als Biomarker große Beachtung gefunden. Trotz wichtiger Fortschritte ist der klinische Nutzen von Flüssigbiopsien weiterhin Gegenstand von Diskussionen und es sind noch einige technische Herausforderungen zu überwinden. Die Detektion von CTC und ctDNA lässt sich nicht bei allen Tumorentitäten gleichermaßen durchführen und es besteht eine gewisse Variabilität unter den Patienten mit gleicher Tumorentität. Beispielsweise ist die Menge an CTC und ctDNA beim NSCLC sehr viel geringer als es bei einer solch aggressiven Erkrankung mit hohem Metastasierungspotenzial zu erwarten wäre [47, 48].

Außerdem weisen einige Patienten mit erheblicher Tumormasse durch makroskopische Metastasen niedrige Mengen an CTC oder ctDNA auf [28, 49]. Am schwierigsten ist der Nachweis bei primärem oder metastatischem Tumorwachstum im Gehirn, was vermutlich an der Blut-Hirn-Schranke liegt, die, anders als bei anderen Organen, Zellen und Zellprodukte daran hindern kann, in großen Mengen ins Blut überzutreten [28].

Weiterhin ist unklar, in welchem Ausmaß dies auf die Tumorbio-logie oder auf ungeeignete technische Verfahren zurückzuführen ist, wie beispielsweise die Verwendung epithelialer Marker bei Patienten mit Karzinomen, die eine EMT durchlaufen haben [13]. Von den zellfreien Nukleinsäuren stammt nur ein kleiner Teil tatsächlich aus Tumorgewebe. Der Großteil dieser Moleküle entstammt abgestorbenen normalen Zellen, wobei diese «Verdünnung» während einer zytotoxischen Krebstherapie, die nicht nur die Krebszellen sondern auch normale Gewebezellen abtötet, beträchtlich sein kann [26, 38]. Außerdem kann die cfDNA-Konzentration auch durch Stress und intensive körperliche Belastung beeinflusst werden [50]. Ein besseres Verständnis dieser Störfaktoren der Flüssigbiopsie-Analysen ist wichtig, um die derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten zu verbessern. Vor Anwendung in der Routinepatientenversorgung müssen die Assays validiert werden – ein zentrales Ziel des europäischen CANCER-ID Konsortiums (www.cancer-id.eu). Dem Qualitätsmanagement der Flüssigbiopsie-Tests kommt hierbei eine entscheidende Bedeutung zu.

CTC ermöglichen das gesamte Spektrum an Analysen auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene und lassen sich darüber hinaus für funktionelle *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen (z.B. Arzneimitteluntersuchungen) an lebenden Zellen einsetzen. Ein Nach-

teil besteht in den niedrigen CTC-Konzentrationen bei vielen Patienten, insbesondere in frühen Krankheitsstadien. Mithilfe der Exosom-Analyse lässt sich ein vergleichbares Spektrum an deskriptiven Analysen durchführen; hinsichtlich funktioneller Untersuchungen ist sie jedoch limitiert. Die ctDNA-Analyse ist auf Mutationen beschränkt, die als Therapieansatzpunkte dienen (druggable) und die überwiegend aus apoptotischen Zellen stammen, wodurch sie nicht immer den therapieresistenten lebenden Tumorzellklon von Krebspatienten widerspiegeln [51]. Jedoch stellte sich die gleiche Herausforderung in kürzlich durchgeführten Arbeiten zu ctDNA und von Tumoren freigesetzten Exosomen, die aus Blutplasma-proben isoliert wurden [28, 47, 48]. Die Lagerung von Blutplasma-proben für retrospektive Untersuchungen ist einfacher, doch spielen auch die präanalytischen Variablen eine wichtige Rolle, um ausreichende Mengen an ctDNA zu gewinnen und eine Verdünnung mit normaler DNA aus abgestorbenen Zellen zu vermeiden. Die Arbeiten zu tumorassoziierten Thrombozyten sind noch relativ jung und die Vor- und Nachteile werden gegenwärtig noch untersucht. Eine Einschränkung der RNA-Analyse in Thrombozyten besteht möglicherweise in der Fragilität der RNA-Moleküle beim Transport klinischer Proben. Derzeit laufen groß angelegte klinische Studien, mit denen der klinische Nutzen nachgewiesen werden soll [52]. Während für die klinischen Anwendungen von Flüssigbiopsien zur Vorhersage von Rezidiven und zur Therapiesteuerung bei Krebspatienten die Evidenzlage ständig zunimmt [49], stellt die Anwendung im Rahmen der Krebs-Früherkennung weiterhin eine große Herausforderung dar [33, 53, 54]. Bereits ein leichter Mangel an Spezifität des Assays würde zahlreiche falsch positive Ergebnisse zur Folge haben und zu einer vermeidbaren Beunruhigung der Patienten verbunden mit enormen diagnostischen Folgekosten führen, wohingegen falsch-negative Ergebnisse wichtige therapeutische Interventionen verzögern würden. Groß angelegte prospektive Kohortenstudien sind erforderlich, um zu überprüfen, ob die identifizierten Mutationen tatsächlich eine maligne Erkrankung anzeigen und umgekehrt, ob nicht vorhandene Mutationen die Abwesenheit einer Krebserkrankung bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschiedenen hier erörterten Flüssigbiopsie-Plattformen einander in der Versorgung von Krebspatienten ergänzen können. Sequenzielle Echtzeit-Flüssigbiopsien sind potenziell in der Lage, frühzeitig eine Resistenz gegenüber der Krebstherapie beim einzelnen Patienten zu erkennen, was ein wichtiges Qualitätsmerkmal der personalisierten Krebsmedizin ist [55]. Eine weitere wichtige Zielsetzung und Herausforderung für zukünftige Studien ist darüber hinaus die Detektion und Charakterisierung einer minimalen Rest-erkrankung nach der Initialtherapie [56].

Disclosure Statement

Die Autoren erklären keine potenziellen Interessenkonflikte.

Literatur

- Ferrari M, Carrera P, Lampasona V, Galbiati S: New trend in non-invasive prenatal diagnosis. *Clin Chim Acta* 2015;451:9–13.
- Aragona CO, Imbalzano E, Mamone F, et al.: Endothelial progenitor cells for diagnosis and prognosis in cardiovascular disease. *Stem Cells Int* 2016;2016:8043792.
- Nascimento da Silva M, Sicchieri LB, de Oliveira Silva FR, et al.: Liquid biopsy of atherosclerosis using protoporphyrin IX as a biomarker. *Analyst* 2014;139:1383–1388.
- Speicher MR, Pantel K: Tumor signatures in the blood. *Nat Biotechnol* 2014;32:441–443.
- Pantel K, Alix-Panabieres C: Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 2013;73:6384–6388.
- Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL: Tumor heterogeneity in the clinic. *Nature* 2013;501:355–364.
- De Luca F, Rotunno G, Salvianti F, et al.: Mutational analysis of single circulating tumor cells by next generation sequencing in metastatic breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:26107–26119.
- Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, et al.: Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Translational Cancer Research* 2015;4:280–290.
- Ashworth T: A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146–149.
- Alix-Panabieres C, Pantel K: Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013;59:110–118.
- Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al.: Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 2013;31:539–544.
- Pantel K, Speicher MR: The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* 2016;35:1216–1224.
- Alix-Panabieres C, Mader S, Pantel K: Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med (Berl)* 2017;95:133–142.
- Alix-Panabieres C, Pantel K: Technologies for detection of circulating tumor cells: Facts and vision. *Lab Chip* 2014;14:57–62.
- Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al.: Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:5701–5710.
- Grobe A, Blessmann M, Hanken H, et al.: Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2014;20:425–433.
- Rink M, Chun FK, Dahlem R, et al.: Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: A prospective study. *Eur Urol* 2012;61:810–817.
- Antonarakis ES, Lu C, Wang H, et al.: AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1028–1038.
- Scher HI, Heller G, Molina A, et al.: Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:1348–1355.
- Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al.: Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2014;15:406–414.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al.: Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013;339:580–584.
- Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, et al.: Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 2015;75:892–901.
- Yu M, Bardia A, Aceto N, et al.: Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014;345:216–220.
- Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al.: Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014;20:897–903.
- Carter L, Rothwell DG, Mesquita B, et al.: Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nat Med* 2017;23:114–119.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426–437.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646–650.
- Bardelli A, Pantel K: Liquid biopsies, what we do not know (yet). *Cancer Cell* 2017;31:172–179.
- Leung F, Kulasingam V, Diamandis EP, et al.: Circulating tumor DNA as a cancer biomarker: Fact or fiction? *Clin Chem* 2016;62:1054–1060.
- Heitzer E, Ulz P, Geigl JB: Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015;61:112–123.
- Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al.: Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108–112.
- Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al.: Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: Circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol* 2014;9:1345–1353.
- Webb S: The cancer bloodhounds. *Nat Biotechnol* 2016;34:1090–1094.
- Qin J, Williams TL, Fernando MR: A novel blood collection device stabilizes cell-free RNA in blood during sample shipping and storage. *BMC Res Notes* 2013;6:380.
- Pucciarelli S, Rampazzo E, Briarava M, et al.: Telomere-specific reverse transcriptase (hTERT) and cell-free RNA in plasma as predictors of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2012;19:3089–3096.
- Olmos D, Brewer D, Clark J, et al.: Prognostic value of blood mRNA expression signatures in castration-resistant prostate cancer: a prospective, two-stage study. *Lancet Oncol* 2012;13:1114–1124.
- Croce CM: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10:704–714.
- Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K: Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:145–156.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al.: Circulating micRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10513–10518.
- Kalluri R: The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 2016;126:1208–1215.
- Greening DW, Xu R, Ji H, et al.: A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol* 2015;1295:179–209.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al.: Tumor exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015;527:329–335.
- Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, et al.: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through met. *Nat Med* 2012;18:883–891.
- Joosse SA, Pantel K: Tumor-educated platelets as liquid biopsy in cancer patients. *Cancer Cell* 2015;28:552–554.
- Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, et al.: Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 2011;118:3680–3683.
- Best MG, Sol N, Kooi I, et al.: RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multi-class, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell* 2015;28:666–676.
- Newman AM, Bratman SV, To J, et al.: An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014;20:548–554.
- Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, et al.: Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* 2016;34:547–555.
- Alix-Panabieres C, Pantel K: Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* 2016;6:479–491.
- Tug S, Helmig S, Deichmann ER, et al.: Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exerc Immunol Rev* 2015;21:164–173.
- Heidary M, Auer M, Ulz P, et al.: The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014;16:421.
- Alix-Panabieres C, Pantel K: Clinical prospects of liquid biopsies. *Nat Biomed Eng* 2017;1:0065.
- Alix-Panabieres C, Pantel K: Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014;14:623–631.
- Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al.: Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17:223–238.
- Wan L, Pantel K, Kang Y: Tumor metastasis: Moving new biological insights into the clinic. *Nat Med* 2013;19:1450–1464.
- Pantel K, Alix-Panabieres C: Tumour microenvironment: informing on minimal residual disease in solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:325–326.