

Ursula Amstutz¹, Tobias Grob², Carlo Largiadè¹, Erik Vassella²

Liquid Biopsy: Tumorgenetik in Körperflüssigkeiten

Die genetische Charakterisierung von Tumoren ermöglichte die Entwicklung von Therapien, die spezifisch auf molekulare Veränderungen im malignen Gewebe abgestimmt sind. Diese gezielten Krebstherapien sind dadurch häufig nur in Tumoren mit bestimmten molekularen Eigenschaften wirksam und haben die genetische Untersuchung von Tumoren zu einem wichtigen Bestandteil der Diagnostik gemacht.

Bedarf für nicht-invasive genetische Tumoruntersuchung

So sind beispielsweise die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) Erlotinib und Gefitinib in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) nur wirksam, wenn im Tumor aktivierende Mutationen im therapeutischen Ziel, der Tyrosinkinasedomäne des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), vorhanden sind [1]. Ein Nachteil dieser Therapien ist das häufige Auftreten sekundärer Resistenzmutationen, die dem therapeutischen Angriffspunkt entgegenwirken. Dies macht die Entwicklung neuer Therapien notwendig, welche den Resistenzmechanismus umgehen. In der Therapie des NSCLC tritt beispielsweise in etwa der Hälfte der gegen Erstgeneration-TKI resistenten Tumore die *EGFR*-Genmutation p.T790M auf [1], welche die Bindung der Medikamente an die EGFR-Tyrosinkinasedomäne behindert. Seit kurzem ist mit Osimertinib nun ein neuer TKI auf dem Markt, der speziell in p.T790M(+)-Tumoren wirksam ist [1] und eine erneute Abklärung des *EGFR*-Mutationsstatus bedingt.

Bis vor kurzem war eine solche Analyse nur durch die Entnahme von Tumorgewebe, z.B. mittels Biopsie, möglich. Dieser invasive Eingriff ist mit Schmerzen und Risiken verbunden. Wie das Beispiel des NSCLC zeigt, sind die molekularen Eigenschaften im Tumor zudem nicht statisch, sondern verändern sich als Antwort auf die Therapie. Deswegen besteht ein Bedarf nach einem nicht-invasiven genetischen Monitoring des Tumors.

Neuer Ansatz: Liquid Biopsy

Hier bietet die Untersuchung von durch Tumorzellen in Körperflüssigkeiten abgegebenem genetischem Material einen vielversprechenden neuen Ansatz. Schon länger ist bekannt, dass vom Tumor stammende DNA im Plasma vorhanden ist [2]. Diese zirkulierende, zellfreie Tumor-DNA (*circulating tumor DNA*, ctDNA) hat ihren Ursprung in apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen [3]. Daneben können auch ganze Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden, sogenannte zirkulierende Tumorzellen [2]. Zudem geben Tumore auch Exosomen – Protein-, RNA- und DNA-haltige Vesikel – in die Zirkulation ab [2]. Die Analytik tumorspezifischer molekularer Eigenschaften in Körperflüssigkeiten anhand dieser Analyte wird unter dem Begriff *Liquid Biopsy* (LB) zusammengefasst [2]. Durch die weniger invasive Probenentnahme stellt die LB eine attraktive Ergänzung zur Gewebebiopsie dar, insbesondere in Fällen, wo letztere nicht möglich ist oder ungenügend Material liefert. Die LB ermöglicht zudem wiederholte Untersuchungen und somit ein longitudinales Monitoring molekularer Veränderungen im Tumor. Schliesslich kann die LB zusätzliche Informationen liefern, die aufgrund von Heterogenität im Tumor mit der punktuellen Gewebebiopsie nicht erfasst werden [3]. In der Tat konnten tumorspezifische Resistenzmutationen im Plasma nachgewiesen werden, die in der Gewebeuntersuchung nicht detektiert wurden [4].

Analytik zirkulierender Tumor-DNA

Momentan am besten etabliert im Gebiet der LB ist die Untersuchung von ctDNA im Plasma. Dort hat mit dem Nachweis der *EGFR* p.T790M Resis-

Biopsie liquide: génétique tumorale dans les fluides corporels

Dans le cadre des traitements anticancéreux adaptés de façon ciblée aux altérations moléculaires spécifiques des tumeurs, la biopsie liquide (l'analyse des propriétés tumorales au moyen d'ADN tumoral acellulaire circulant, de cellules tumorales circulantes ou d'exosomes provenant de la tumeur) permet une analyse génétique non invasive complémentaire à la biopsie tissulaire. La biopsie liquide a déjà trouvé une application clinique dans le traitement du cancer du poumon dans le cadre des mutations de résistance (p.T790M EGFR). Comme l'ADN tumoral circulant ne constitue souvent qu'une partie minime de l'ADN acellulaire contenu dans le plasma, des méthodes à la sensibilité élevée sont requises, par exemple la PCR digitale ou des méthodes spécialisées de séquençage haut débit. Grâce à la biopsie liquide, un contrôle génétique plus exhaustif des tumeurs solides permettant un ajustement du traitement en conséquence pourrait bientôt devenir réalité.

tenzmutation in der Behandlung des NSCLC bereits eine erste Anwendung den Weg in die Klinik gefunden [5]. Ermöglicht wurde dies nicht zuletzt durch technische Fortschritte in der Sensitivität der Analysemethoden, die den Nachweis nur weniger aus ctDNA stammender Genkopien ermöglichen. Für den gezielten Nachweis häufiger

Zukunftsversprechen der Liquid Biopsy: molekulare Veränderungen bei soliden Tumoren im zeitlichen Verlauf zu überwachen.

Tumormutationen wie *EGFR* p.T790M wird vielerorts die digitale PCR eingesetzt. Durch die Partitionierung des PCR-Ansatzes in tausende einzeln analysierbare Reaktionsgefässe (z.B. mittels Ölemulsion) erreicht diese Methode eine deutlich höhere Sensitivität als die *real-time* PCR und ermöglicht selbst bei Mutationsfrequenzen von <1% ein quantitatives Ergebnis [6]. Mit dem cobas® *EGFR* Mutation Test ist daneben auch eine automatisierte LB-Methode verfügbar.

Bei der Untersuchung von ctDNA gilt es, für dessen Präanalytik einige Besonderheiten des Probenmaterials zu beachten. Durch ihren Ursprung in der Apoptose ist die zellfreie DNA (cfDNA) stark fragmentiert und liegt im Plasma in Fragmenten von rund 166 Basenpaaren Länge vor. CfDNA aus mehrheitlich lymphatischen Zel-

¹ Universitätsinstitut für Klinische Chemie und Zentrum für Labormedizin, Inselspital Bern, Universität Bern

² Institut für Pathologie, Universität Bern



len ist auch bei gesunden Personen im Plasma vorhanden. Der relative Anteil an ctDNA in der cfDNA kann stark variieren und beträgt nicht selten <1% [7]. Um diesen geringen Anteil nicht zusätzlich artifiziell zu verringern, muss in der Präanalytik eine Lyse kernhaltiger Blutzellen verhindert werden [8]. Dies wird entweder durch ein sofortiges Abtrennen des Plasmas erreicht oder durch die Verwendung spezieller, mit einem Stabilisator versehener cfDNA-Blutentnahmeröhrchen [9]. Mit den heutigen Analysemethoden ist die Sensitivität einer LB-Analyse häufig nicht technisch limitiert, sondern durch die verfügbare Menge an Probenmaterial. CfDNA liegt im Plasma oft nur in geringen Mengen vor (<10 ng/ml Plasma). Dies bedeutet, dass die Gesamtzahl analysierbarer Genkopien ein entscheidender Faktor für die maximal erreichbare Sensitivität darstellt. Verbessert werden kann diese durch ein grösseres Probenvolumen. So werden für LB-Analysen in der Regel mehrere Milliliter Plasma benötigt.

Neue Methoden für breiteres genetisches Screening

Neben der gezielten Analyse einzelner Tumormutationen in der ctDNA findet auch eine rasante Entwicklung in Methoden der Hochdurchsatz-Sequenzierung (*high-throughput sequencing*, HTS) statt, welche ein breiteres genetisches Screening ermöglicht. Wegen der geringen Menge ctDNA ist auch für HTS-basierte LB-Analytik eine hohe Sensitivität essentiell. Insbesondere gilt es, echte Tumormutationen von PCR-Artefakten und Sequenzierfehlern zu unterscheiden. Mit speziell für die Analytik von cfDNA entwickelten Methoden wird dies durch molekulare *Identifiers* (MIDs) erreicht [10]. Dabei wird jedes DNA-Molekül im Ausgangsmaterial mit einer einzigartigen Nukleotidsequenz verknüpft und so ein Rückschluss ermöglicht, welche Sequenzen vom selben Ausgangsmolekül stammen. Kombiniert mit bioinformatischen Methoden zur Erkennung von Sequenzierfehlern erreichen nun auch HTS-basierte Methoden in der LB-Analytik eine Sensitivität von <1% [10].

Ein umfassendes Monitoring molekularer Veränderungen im Tumor bietet die Möglichkeit, im Verlauf einer Therapie neu auftretende Mutationen zu detektieren und Resistenzmechanismen zu identifizieren [11,12]. Veränderungen in der Menge ctDNA im Plasma könnten zudem als früher Indikator für die Wirksamkeit einer Therapie dienen oder als Indikator für *Residual Disease*, ähnlich wie in der Leukämiediagnostik. Darin liegt das Zukunftsversprechen der Liquid Biopsy: in der Möglichkeit, bei soliden Tumoren molekulare Veränderungen im zeitlichen Verlauf überwachen zu können [12].

Korrespondenz:
ursula.amstutz@insel.ch

Referenzen

Online unter: www.sulm.ch/d/pipette → Aktuelle Ausgabe (Nr. 6-2017).



GEM® Premier 5000

Das intelligente Blutgas-Analysesystem

Die Vorteile des GEM Premier 5000 Analysesystems:

- Qualitätsprüfung mit Echtzeiterkennung (iQM2): Sofortige automatische Fehlerkorrektur und automatische Dokumentationssicherung
- 1-Kassettentechnologie: All-in-One Kassette für eine noch einfachere Handhabung
- Bedienerfreundlichkeit: Einfache Handhabung dank einheitlicher Oberfläche
- Wartungsfreies Analysesystem: Nur 1 einzige Kassette monatlich zu wechseln
- Echtzeit-Datenübertragung (GEMweb Plus): Drahtlose Datenübertragung in Echtzeit an das LIS oder KIS dank integriertem WLAN

