



Ursula Amstutz<sup>1</sup>

# Am Puls der Forschung: Hochdurchsatzsequenzierung in Liquid Biopsies

Die nichtinvasive Untersuchung molekularer Gewebeeigenschaften in Körperflüssigkeiten, auch bekannt unter dem Liquid Biopsy (LB), ist ein intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet der molekularen Diagnostik und steht an der Schwelle zur klinischen Anwendung [1]. Die Analytik zirkulierender zellfreier DNA (cfDNA), zirkulierender Tumorzellen oder zirkulierender Vesikel (Exosomen) hat nicht zuletzt dadurch rasant an Aufmerksamkeit gewonnen, dass die dafür notwendigen hochsensitiven Technologien mittlerweile für Forschungs- und Diagnostiklabors zugänglich geworden sind.

## Hauptanwendungsgebiet Tumordiagnostik

Die nicht invasive Tumordiagnostik ist eine der primären Anwendungs- und Entwicklungsgebiete der LB. Durch die Zunahme zielgerichteter Krebstherapien, deren Wirkungsmechanismus auf spezifische molekulare Veränderungen im Tumor ausgerichtet ist, gewinnt die molekulare Tumordiagnostik zunehmend an Bedeutung. Die LB kann dabei ohne invasiven Eingriff zusätzliche Informationen zum Mutationsstatus im Tumor liefern und ergänzt so die traditionelle Gewebediagnostik. [1] In der klinischen Diagnostik

erarbeitet und genutzt, um molekulare Tumoreigenschaften in der LB globaler zu erfassen.

## Sensitivitätssteigerung dank Erkennung von Artefakten

Eine Sequenzierung relevanter Genregionen bietet dabei die beste Möglichkeit, ein breites Spektrum im Tumor vorliegender molekularer Veränderungen zu erfassen. Mittels Hochdurchsatzsequenzierung (HDS) ist dieser Ansatz in der Gewebediagnostik bereits etabliert. Um ähnliche Analytik auch in Kleinstmengen Untersuchungsmaterial anzuwenden, wie sie in der LB vorliegen, sind spezielle Anpassungen in der Probenaufbereitung und der bioinformatischen Datenverarbeitung erforderlich [2]. Die geringe DNA-Menge, die aus LBs gewonnen wird, macht eine PCR-basierte Amplifikation unabdingbar. Hinzu kommt, dass die Tumor-DNA (ctDNA) in der cfDNA oft nur einen winzigen Bruchteil ausmacht. Um in einem Frequenzbereich von <1% PCR-Artefakte und Sequenzierfehler von echten tumorassoziierten Mutationen unterscheiden zu können, wird jedes Ursprungsmolekül zu Beginn der Probenaufbereitung mit einer kurzen, einzigartigen DNA-Sequenz versehen. Dieser molekulare Identifikator (MID) wird mitsequenziert und ermöglicht es, alle Sequenzen, die vom gleichen Ursprungsmolekül abstammen, zusammenzuführen. So kann bei der Mutationsdetektion berücksichtigt werden, ob eine Sequenzvariante auf allen vom gleichen Molekül stammenden Sequenzen auftritt und wie oft sie in unterschiedlichen Ursprungsmolekülen beobachtet wird. Die Sensitivität der LB-HDS konnte zusätzlich verbessert werden

durch bioinformatische Algorithmen, die spezifische, in der cfDNA häufig auftretende Sequenzierartefakte aus den Daten filtern. So kann insgesamt das Hintergrundrauschen in den HDS-Daten soweit reduziert werden, dass die Detektion tumorspezifischer Mutationen auch bei einem niedrigen ctDNA-Anteil möglich wird [2].

## Räumliche und zeitliche Tumorerheterogenität

Wie kann nun eine LB-basierte umfassende Sequenzierung die Gewebediagnostik ergänzen? Die hohe Mutationsrate maligner Zellen führt nicht nur zu hoher genetischer Heterogenität innerhalb eines Tumors oder zwischen Metastasen, sondern auch zu dynamischen Veränderungen der Mutationslandschaft über die Zeit. So widerspiegelt das Mutationsspektrum einer Gewebibiopsie des Primärtumors nicht zwangsläufig sämtliche im malignen Gewebe vorhandenen Subklone und auch nicht alle molekularen Eigenschaften einer Metastase oder eines Rezidivs. Die in einer LB vorhandene ctDNA, die Tumorzellen oder Exosomen können von verschiedenen malignen Zellverbänden abstammen und so zusätzliche Informationen über im Körper anwesende tumorassoziierte Mutationen liefern. Bei einer Brustkrebspatientin konnten z.B. in der cfDNA genetische Veränderungen nachgewiesen werden, die spezifisch nur in einzelnen Metastasen auftraten [3]. Gleichzeitig zeigt die serielle Untersuchung von LB-Proben, dass sich das Mutationsspektrum und die relative Häufigkeit der einzelnen Sequenzvarianten in der cfDNA im Verlauf einer Behandlung verändern. Die Muster dieser Veränderungen deuten

Die LB-HDS bietet ein aufregendes Tool, um unser Verständnis molekularer Veränderungen im Tumor, die durch Krebstherapien hervorgerufen werden, weiter zu verbessern.

steht in der LB-Analytik momentan der Nachweis einzelner therapierelevanter Tumormutationen im Vordergrund. Dabei wird in der cfDNA gezielt nach häufig auftretenden tumorassoziierten Mutationen gesucht. Während diese gezielte Analytik (z.B. mittels digitaler PCR) Vorteile bietet wie eine hohe Sensitivität und schnelle Resultate, hat sie den grossen Nachteil, dass damit nur ein Bruchteil des Mutationsspektrums eines Tumors erfasst wird. In der Forschung werden deswegen Methoden

<sup>1</sup> Dr. phil. nat. Ursula Amstutz  
Universitätsinstitut für Klinische Chemie und  
Zentrum für Labormedizin, Inselspital Bern,  
Universität Bern



darauf hin, dass sie zumindest teilweise durch die Krebstherapie selbst verursacht werden. Während der Therapie nehmen Subklone von Zellen, die weniger sensitiv auf eine Behandlung reagieren, an Häufigkeit zu, während andere Zellpopulationen stärker eliminiert werden. Dies scheint sich im Anteil einzelner Sequenzvarianten in der cfDNA widerzuspiegeln. So korrelieren zeitliche Veränderungen in der Frequenz tumorassoziierter Mutationen in der cfDNA mit Änderungen in der Krebstherapie. Eine HDS der cfDNA vor und nach einer Therapie konnte z.B. in allen analysierten Patienten Mutationen identifizieren, die mit Resistenz gegenüber der jeweiligen Therapie assoziiert sind und deren Frequenz im Verlauf der Behandlung zunahm. Wurde auf ein anderes Medikament gewechselt, nahm der Anteil dieser Mutation nicht mehr zu, sondern nahm zum Teil sogar ab [4]. Ein ähnliches Muster wurde in der Behandlung des Kolonkarzinoms mit Anti-EGFR-Therapien für Resistenzmutationen im KRAS-Gen beschrieben [5]. Zusammen werfen diese Beobachtungen die spannende Frage auf, ob Patienten, in denen eine Resistenzmutation in der cfDNA nach einem Therapiewechsel abnimmt und schliesslich nicht mehr nachweisbar ist, zu einem späteren Zeitpunkt allenfalls von einer erneuten Therapie mit dem betreffenden Medikament profitieren könnten.

### Marker für Therapiewirkung

Zusätzlich zum Verlauf einzelner Tumormutationen ermöglicht die LB-HDS auch eine Abschätzung des Anteils an ctDNA in der cfDNA. Dieser ctDNA-Load kann ebenfalls potenziell behandlungsrelevante Informationen

liefern. Erste Daten deuten darauf hin, dass bereits nach einem Therapiezyklus eine Abnahme des ctDNA-Load ein Ansprechen auf eine Behandlung indiziert, während ein konstanter oder ansteigender ctDNA-Anteil auf eine fortschreitende Erkrankung hindeutet [6]. Insgesamt bietet die LB-HDS ein aufregendes Tool, um unser Verständnis molekularer Veränderungen im Tumor, die durch Krebstherapien hervorgerufen werden, weiter zu verbessern [7]. Bisher sind die vorhandenen Studien korrelativ und beschränken sich auf limitierte Patientenzahlen. Inwiefern sich durch ein breites Monitoring tumorassoziierter Mutationen in LBs Therapieentscheide ableiten lassen, die den Behandlungserfolg verbessern, wird die laufende und zukünftige Forschung zeigen.

Zurück im diagnostischen Labor zeigt die LB zudem, wie im Bereich der molekularen Diagnostik traditionelle Laborbereiche miteinander verschmelzen. Das Potenzial der LB kann bestmöglich ausgeschöpft werden, wenn diese Laborbereiche Hand in Hand zusammenarbeiten. So wird am Inselspital Bern die LB-Analytik in Partnerschaft zwischen klinischer Chemie und molekularer Pathologie und zukünftig in einem gemeinsamen molekulardiagnostischen Labor durchgeführt. Der Klinik bietet eine solche Kooperation eine vereinfachte Diagnostik durch koordinierte Prozesse und einheitliche Ansprechpartner. Fürs Labor kann sie ein Wegbereiter sein für eine Zukunft der genomischen Medizin, die fächerübergreifend Analytik nach dem neusten Stand der Technik anbietet.

Korrespondenz:  
Ursula.Amstutz@insel.ch

## Au rythme de la recherche: séquençage haut débit des biopsies liquides

L'analyse noninvasive des propriétés moléculaires des tissus contenus dans les liquides corporels, également appelée Biopsie Liquide (BL), est un domaine de recherche exploré en profondeur et qui est au seuil de l'application clinique. L'attention s'est rapidement portée sur l'analyse de l'ADN libre circulant (ADNlc), des cellules tumorales circulantes ou des exosomes en particulier, de telle sorte que les technologies ultra-sensibles requises sont désormais accessibles dans les laboratoires de recherche et de diagnostic. En matière de diagnostic, la détection des seules mutations tumorales pertinentes pour la thérapie est actuellement prioritaire dans l'analyse de BL, tandis qu'en recherche, des analyses plus complètes du spectre des mutations sont menées à l'aide du séquençage haut débit, entre autres pour déterminer l'utilité de ces informations dans la prise de décision thérapeutique.

### Referenzen

- 1 Amstutz, U., Grob, T., Largiadèr, C. R. & Vassella, E. Liquid Biopsy: Tumorgenetik in Körperflüssigkeiten. *Pipette* 6, 11–12 (2017).
- 2 Newman, A. M. et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* 34, 547–555 (2016).
- 3 Murtaza, M. et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun* 6, 1–6 (2015).
- 4 Murtaza, M. et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497, 108–112 (2014).
- 5 Siravegna, G. et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 21, 795–801 (2015).
- 6 Oellerich, M. et al. Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 54, 205–218 (2017).
- 7 Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S. & Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 486, 537 (2017).