

Liquid Biopsy

Erfahrungen aus der Hämatopathologie Hamburg

Dr. Markus Falk, Stefanie Schatz M. Sc., Prof. Dr. Markus Tiemann, Institut für Hämatopathologie Hamburg



Die „Liquid Biopsy“ genannte Analyse von zellfreier DNA (cfDNA) aus peripherem Blut hat als Alternative zur klassischen Rebiopsie die Rezidivtestung bei Patienten mit soliden Tumoren bereits jetzt nachhaltig verändert. In geringerem Ausmaß kommt die Liquid Biopsy auch bei der Primärtestung zur Anwendung, dann, wenn keine invasive Diagnostik am Patienten möglich ist. Für den tumorassoziierten Mutationsnachweis an cfDNA gelten einige technische Anforderungen, die der geringen DNA-Konzentration Rechnung tragen. Im Folgenden werden unsere methodischen Erfahrungen bei der Etablierung der cfDNA-Analyse vorgestellt und deren Einsatzmöglichkeiten beleuchtet.

cfDNA/ctDNA und CTC

Apoptotische Tumorzellen entlassen cfDNA (Synonym: zirkulierende Tumor-DNA/ctDNA) ins Blut, die zur molekulargenetischen Analyse auf tumorassoziierte Mutationen aus dem Blutplasma extrahiert werden kann. Allerdings geben auch vormals gesunde Körperzellen DNA ans Blut

ab, daher kann der prozentuale Anteil der Tumor-DNA sehr niedrig (unter 1 % Tumorallel) bzw. gar nicht nachweisbar sein. Um dieser geringen DNA-Konzentration Rechnung zu tragen, gelten für den Mutationsnachweis an ctDNA einige technische Mindestanforderungen (s. u.).

Streng genommen beinhaltet der Begriff „Liquid Biopsy“ noch eine weitere Facette, nämlich die Analyse intakter zirkulierender Tumorzellen (CTC). Diese Technologie eignet sich bislang nicht für routinediagnostische Zwecke, weil mit ca. 0–10 CTC/ml Blut zu wenige Zellen zirkulieren und auch die daraus extrahierbaren DNA-Mengen für eine stabile Mutationsanalyse zu gering sind. Darüber hinaus beruhen die gängigen Isolierungsverfahren auf der Nutzung von CTC-gerichteten Antikörpern (v. a. epitheliale Marker wie EpCAM und den Cytokeratinen 8, 18, 19). Diese jedoch binden keine Zellen, die eine Epidermal-mesenchymale Transition* durchlaufen und auch das metastatische Potenzial singulärer CTCs

ist nicht eindeutig beschrieben.¹ Dennoch ist die CTC-Analyse von hohem Wert für Forschungsansätze und aus der absoluten Anzahl der CTC lassen sich entitätsübergreifend Prognosen ableiten.^{2–4}

Erfahrungen zur Präanalytik

Die Halbwertszeit (HWZ) von ctDNA beträgt nur ca. 1,5 Stunden.⁵ Daher war es entscheidend, die ctDNA-Extraktion unmittelbar nach der Blutabnahme zu beginnen und über den gesamten Zeitraum eine strikte Kühlkette einzuhalten. Diese Anforderung erwies sich insofern als hinderlich, als sie seitens der Kliniker wenig praktikabel und mit zusätzlichen Kosten verbunden war (z. B. Kühlzentrifuge, aufwändiger Trockeneistransport). Dies limitierte letztendlich den Einsatz der Liquid Biopsy.

Die anfänglichen Hürden konnten wir mit der Einführung ctDNA-stabilisierender Vakuum-Röhrchen (s. u.) überwinden, die ursprünglich für die Pränataldiagnostik entwickelt worden waren. Kernkomponente dieser Probenröhrchen ist ein Formalin-Analogon, welches die im Vollblut enthaltenen Zellen fixiert und verhindert, dass Wildtyp-DNA aus Leukozyten die an sich schon spärliche Tumor-DNA weiter verdünnt. Die kurze HWZ der ctDNA ist der Präsenz von DNasen geschuldet, daher sind – neben einem Antikoagulant – DNase-Inhibitoren weitere Bestandteile der Röhrchen. Zur Blutabnahme selbst sind Butterfly-Vakuum-Adapter notwendig. Nach Blutentnahme ist die ctDNA laut Herstellerangaben bis zu einer Woche bei Raumtemperatur stabil. Die so gewonnenen Proben eignen sich diesbezüglich also für den Postversand.

Für die Probenintegrität sind darüber hinaus folgende Aspekte zu beachten:

- Die Röhrchen fassen 8 ml Blut, die Einhaltung dieses Füllstandes ist wichtig, um Hämolyse durch mechanische

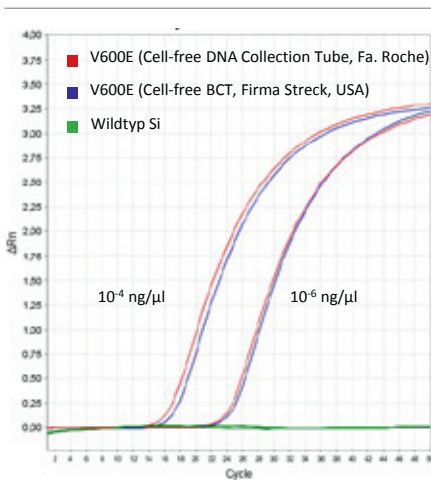


Abb. 1: Vergleich der Stabilität synthetischer DNA in Streck- vs. Roche-Röhrchen. Je 8 ml Vollblut eines gesunden Probanden wurden in jeweils zwei Liquid Biopsy-Röhrchen der Hersteller Streck, USA und Roche (Ariosa) abgenommen, mit synthetischen DNA-Konstrukten (BRAF V600E) in zwei verschiedenen Konzentrationen gemischt und zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert. Daraufhin wurde die zellfreie DNA extrahiert (cobas cfDNA Sample Preparation Kit) und mittels MGB-Sondenspezifischer Realtime-PCR auf die BRAF V600E und das Wildtypallel untersucht.

Beanspruchung beim Transport zu minimieren (eine Hämolyse ist gewöhnlich zu ca. 80 % auf falsche venöse Abnahmetechnik zurückzuführen und zu ca. 20 % transportbedingt).

- Direkt nach der Blutabnahme muss das Röhrchen 10 x geschwenkt (nicht geschüttelt!) werden, um eine gleichmäßige Fixierung zu gewährleisten.

Ein Röhrchen mit 8 ml Vollblut pro Patient ist für eine Analyse ausreichend. Wir haben Röhrchen von zwei Herstellern getestet (Cell-free DNA BCT; Fa. Streck, USA und Cell-free DNA Collection Tube; Fa. Roche Diagnostics, Schweiz) und keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf die Stabilität der cfDNA beobachtet: In beiden Fällen war die synthetisch beigefügte DNA in vergleichbarer Konzentration, die Wildtyp-DNA dagegen nicht nachweisbar (Abb. 1). Letz-

teres spricht für eine effektive Fixierung der Blutleukozyten.

In unserem Institut bevorzugen wir die Cell-free DNA Collection Tubes von Roche, weil diese im Gegensatz zu den Röhrchen der Fa. Streck nicht aus Glas sondern aus Kunststoff bestehen. Dies erleichtert Transport und Handling im Labor. Zudem sind die Roche-Tubes mit Schraubdeckeln versehen (Gummi-stopfen beim Hersteller Streck), was sich als großer Vorteil in der Handhabung erwiesen hat. Die Schraubdeckel erlauben ein sauberes, kontaminationsfreies Arbeiten und erleichtern so die Plasma- bzw. DNA-Extraktion.

Bewertung der Analytik

Zur DNA-Extraktion sind verschiedene kommerzielle Kits erhältlich, z. B. der cobas cfDNA Sample Preparation Kit von Roche Diagnostics oder der QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit von Qiagen, Hilden. Die Methodik unterscheidet sich nicht wesentlich von herkömmlichen DNA-Extraktionskits. Die Affinitätssäulen sind auf niedermolekulare DNA ausgerichtet, da cfDNA kurzfragmentig (ca. 180 bp) ist. Auch diesbezüglich empfinden wir das Roche-Produkt als ausgefeilter, weil es eine zeitsparende und benutzerfreundliche DNA-Extraktion ermöglicht.

Für eine valide Mutationsanalyse ist die Analyseplattform entscheidend. Die herkömmliche Sanger-Sequenzierung, bis heute Standard in den meisten deutschen molekularpathologischen Labors, ist aufgrund ihrer geringen Sensitivität (20 % Tumorallel nötig) für die Plasmatestung nicht ausreichend. ctDNA aus apoptotischen Tumorzellen ist im Blut sehr gering konzentriert (0–100 ng/ml) und zudem durch DNA aus Nicht-Tumorzellen stark verdünnt. Deshalb ist mindestens ein Realtime-PCR-basierter Assay, wie beispielsweise der cobas EGFR Mutation Test V.2 mit einer Nachweisgrenze

von ca. 2–5 % Tumorallel zu verwenden. Geeignet sind außerdem ähnlich sensitive Next Generation Sequencing (NGS)-Methoden mit entsprechend hoher „Coverage“ (möglichst > 1000 reads pro Amplikon).

Anfänglich wurden die Ergebnisse aus Liquid Biopsy-Testungen durchaus kritisch betrachtet, denn Wildtyp-Resultate (z. B. EGFR-Wildtyp) bedeuten nicht zwangsläufig, dass keine Mutation vorliegt. Es besteht alternativ die Möglichkeit, dass ein Tumor in nicht ausreichendem Maße DNA an das Blut freigibt. Eine Reihe technischer Neuerungen und die beschriebenen empfindlicheren Testverfahren jedoch haben die Durchführung der Liquid Biopsy sehr sicher gemacht. Die Spezifität liegt bei annähernd 100 %. Dies bedeutet: Eine über Liquid Biopsy detektierte EGFR-Mutation ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch in der soliden Tumorbiopsie vorhanden. Die Sensitivität hingegen liegt bei „nur“ etwa 70–80 %. Das heißt: In etwa 20–30 % der Fälle liefert die Liquid Biopsy falsch negative Ergebnisse – eine

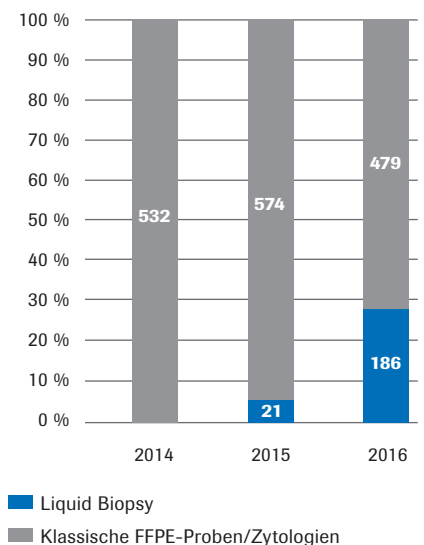


Abb. 2: Entwicklung der Liquid Biopsy-Testung bei Adenokarzinomen der Lunge in Relation zu klassischen Tumorbiopsien in der Hämatopathologie Hamburg in den Jahren 2014–2016.

Rate, die zur Vorsicht mahnt! Deshalb sollte sich die Liquid Biopsy auf Patienten beschränken, bei denen z. B. aufgrund von Komorbidität kein klassisches Tumormaterial gewonnen werden kann.

Die Sensitivität der cfDNA-Analytik lässt sich indirekt durch klinische Parameter erhöhen, z. B. indem Patienten mit entsprechend hoher Tumorlast oder schneller Progredienz getestet werden.

Blick auf die weitere Entwicklung

Neben der alternativen Primär- bzw. Rezidivdiagnostik (wenn klassisches Analysematerial fehlt) ist das Verfahren der Liquid Biopsy heute schon insbesondere zur Rezidivanalyse bei Patienten mit Treibermutation unter stratifizierter Therapie interessant. Denn sind Primärtumor und/oder Metastasen progredient, kann eine Therapieänderung notwendig sein.

Tatsächlich haben technische und praktische Weiterentwicklungen eine bemerkenswerte Zunahme von Liquid Biopsy-Anforderungen, vor allem für die Rezidivtestung, gefördert. Abb. 2 zeigt diesen Anstieg am Beispiel von Lungen-Adenokarzinomen, die in unserem Institut auf EGFR-Mutationen getestet wurden. Vor 2015 erfolgte die Testung an

dieser Gruppe ausschließlich konventionell, anhand von Zytologien und vor allem solidem Tumormaterial.

Allerdings besteht ein Problem bei der Abrechnung. Zwar ist das NGS zur Mutationsanalyse in der Pathologie nach langem Ringen seit Juli 2016 im EBM-Katalog Kapitel 19.4 „In-vitro-Diagnostik tumorgenetischer Veränderungen“ abgebildet, nicht enthalten ist allerdings die Liquid Biopsy. Man kann versuchen, über eine Abtretungserklärung des Patienten und einen Kostenübernahmeantrag an die Krankenkasse eine Vergütung zu gewährleisten. Immerhin belaufen sich die Kosten einer EGFR-Testung aus Plasma auf ca. 400 Euro.

Die deutliche Zunahme der Liquid Biopsy-Testung lässt auf ihren großen klinischen Nutzen schließen. Wäre ein adäquater Preis im Vergütungssystem abgebildet, könnten reichlich Kosten für invasive Diagnostik gespart und Patienten effektiver der passenden personalisierten Therapie zugeführt werden. Hierfür sehen wir eine unbedingte Notwendigkeit und können keinen medizinischen Beweggrund ausmachen, dieser Leistung die Vergütung zu verweigern. Kompetenzdiskussionen zwischen Fachärztesgruppen dürfen hierfür kein Grund sein. Es bleibt also zu hoffen, dass dieses wertvolle

neue Verfahren in absehbarer Zeit in die vertragsärztliche Versorgung in Deutschland integriert wird.

In Zukunft ist die Liquid Biopsy durchaus auch als MRD (minimal residual disease)-Kontrolle denkbar. Regelmäßige (z. B. alle drei Monate) Plasmakontrollen auf Resistenzmutationen (z. B. EGFR T790M oder ALK L1196M) könnten Informationen über eine etwaige genetisch begründbare Rezidivbildung mit prädiktiven Aussagen zur Therapiewirksamkeit liefern, bevor die klinische Symptomatik sehr ausgeprägt ist (Abb. 3). Der dann ebenfalls deutlich kleinere Tumor ließe sich vermutlich leichter kontrollieren – ein echter Mehrwert für die Patienten.

*** Epithelial-mesenchymale Transition:** Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften während der Embryonalentwicklung. Dabei werden Zellkontakte aufgelöst und eine Migration von Zellen in anderes Gewebe ermöglicht. Dieser Phänotypwechsel liegt auch der Metastasierung von Tumoren zugrunde.

Literatur

- 1 Aceto N et al: Cell (2014); 158(5): 1110–1122. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013
- 2 Cristofanilli M et al: NEJM (2004); 351(8): 781–791
- 3 Hu B et al: Cancers (2013); 5(4): 1676–1690. doi:10.3390/cancers5041676
- 4 Muñelo-Romay L et al: Cancers (2014); 6(1): 153–165. doi:10.3390/cancers6010153
- 5 Bettgeowda C et al: Sci Transl Med. (2014); 6(224): 224ra24

Korrespondenzadresse



Dr. Mark Falk
 Leiter Abt. Forschung und Entwicklung
 in der Molekularpathologie
 Dres. Tiemann & Schulte Partnerschaft
 Institut für Hämatopathologie Hamburg
 Fangdieckstr. 75a
 22547 Hamburg
 falk@hp-hamburg.de

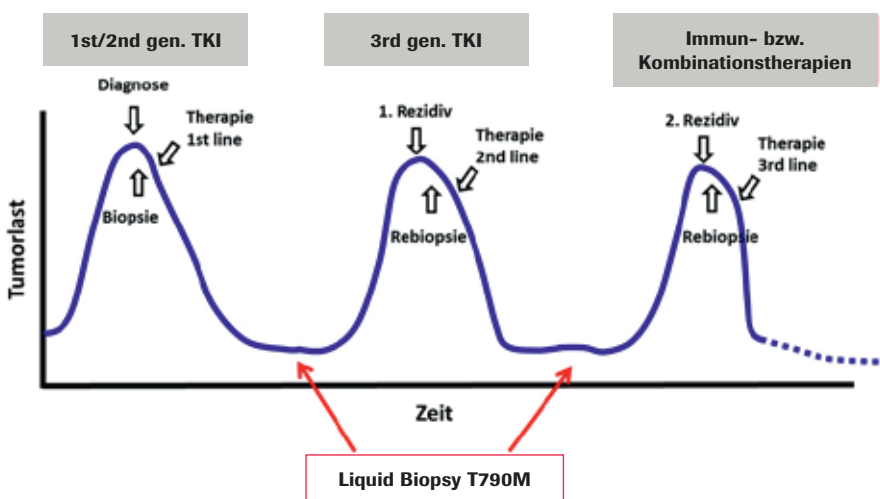


Abb. 3: Liquid Biopsy als mögliche MRD-Kontrolle.