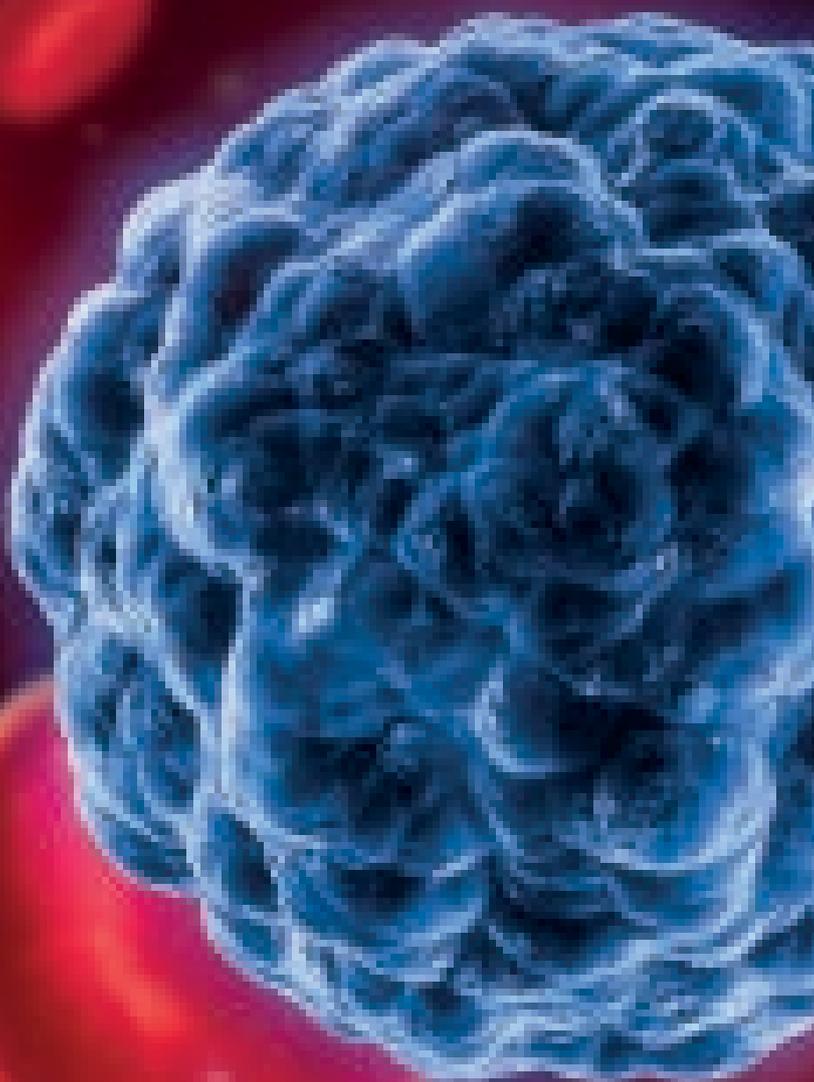


Präanalytik

Flüssigbiopsie

Anne Wesche¹, Anna Babayan²

Zu den wichtigsten Biomarkern zählen die aus einer Liquid Biopsy isolierten CTCs (circulating tumor cells) und ctDNA (circulating tumor DNA), denn sie erlauben prognostische und prädiktive Aussagen für eine Krebstherapie. Um die zahlreichen zurzeit existierenden Bluttests in die klinische Praxis einzuführen, muss unter anderem die Präanalytik standardisiert werden, denn von der Probengewinnung bis zur DNA-Isolierung fehlen bisher einheitliche Verfahrensordnungen (SOPs).



CTCs haben sich vom Tumor abgelöst und sind in den Blutkreislauf eingewandert. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl im Blut ist sehr gering. Ihre Anzahl dient als anerkannter Surrogatmarker für Überlebensprognosen beim Mamma-, Prostata und kolorektalen Karzinomen. Der Nachweis von krebsbezogenen Mutationen und Veränderungen in den CTCs auf DNA-, RNA- und Proteinebene ist möglich, dennoch ist die Einzelzellanalyse nur bedingt standardisierbar.

ctDNA gelangt von apoptotischen Tumorzellen in die Blutzirkulation. Sie liegt in Fragmenten mit einer Größe von rund 166 bp vor [1]. Je nach Krankheitsstadium und Tumorentität und sogar innerhalb einer Tumorentität, kann es zu einer erheblichen Variabilität der ctDNA-Konzentrationen kommen. In der Sequenz der ctDNA kann sehr spezifisch nach Mutationen gesucht werden, zum Beispiel nach der EGFR-T790M-Mutation, die für eine Therapie-Resistenz gegen TK-Inhibitoren bei NSCLC (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) verantwortlich ist.

Hochsensitive Nachweisverfahren, wie die digitale PCR und Berechnungen anhand bioinformatischer Algorithmen aus NGS-Daten, erlauben schon heute geringste molekulargenetische Veränderungen zu detektieren auch wenn die Nachweise im Grenzbereich der Analytik liegen. Damit ermöglicht der technische Fortschritt die kontinuierliche Überwachung der Tumorlast in Echtzeit. Allerdings sind dadurch die Anforderungen an die Qualität des Probenmaterials sehr hoch.

Probengewinnung

Ein großer Vorteil der Liquid Biopsy ist die nichtinvasive Gewinnung von CTCs und ctDNA. Die Blutabnahme erfolgt routinemäßig in ein 10 mL Röhrchen. Jedoch können hier bereits die ersten Schwierigkeiten beginnen.

Krebspatienten in fortgeschrittenem Stadium haben oft schlecht auffindbare Venen, so dass sich die Blutentnahme im Rahmen des Monitorings schwierig gestalten kann. Daher ist nicht sichergestellt, dass immer die erforderliche Blutmenge, die für eine Analyse benötigt wird auch erhalten wird. Patientenblut, das zudem unter oder kurz nach

einer Chemotherapie abgenommen wurde, zeigt weitere Beeinträchtigungen, die sich in der Probenqualität widerspiegeln.

CTCs werden aus Vollblut und ctDNA aus dem Plasma isoliert. Theoretisch könnte das Plasma für die ctDNA-Isolierung im ersten Schritt abzentrifugiert werden. Um das Plasma sicher von der Zellfraktion abzutrennen, müssen starke

Zentrifugationskräfte (10 min, 2000 g) eingesetzt werden. Dies kann zu Beschädigungen der Zellen und auch der CTCs im Blut führen. Eine erste mildere Zentrifugation um die Fraktionen zu trennen, gefolgt von einem stärkeren Zentrifugationsschritt des Plasmas, würde einen Ausweg bieten. Dabei ist zu bedenken, dass einzelne Zellen, und CTCs, sich beim ersten



The New Perspective in ICP-MS PlasmaQuant® MS | PlasmaQuant® MS Elite

PlasmaQuant® MS: Das universelle Gerät für ein breites Einsatzspektrum

PlasmaQuant® MS Elite: Die erste und einzige Wahl für Forschungsanwendungen

- Eco Plasma: Robustes Plasma mit halbem Argon-Verbrauch
- iCRC – integrierte Kollisions-Reaktions-Zelle: Interferenzfreie Analyse plus BOOST Technologie
- ReflexION: 3D fokussierender Ionenspiegel für unübertroffene Empfindlichkeit
- HD Quadrupole: Echter 3 MHz Quadrupol mit ausgezeichneter Massentrennung
- ADD^{IQ} – All-Digital Detection System: 10 Größenordnungen linear dynamischer Bereich

www.analytik-jena.de

analytik jena
ANALYTIK JENA GROUP

milderen Zentrifugationsschritt nicht vollständig absetzen. In beiden Fällen besteht also die Gefahr des CTC-Verlustes und als Folge daraus deren Unterrepräsentation.

Blutentnahmeröhrchen

Einen weiteren limitierenden Faktor stellen die Blutröhrchen dar. EDTA-Röhrchen, die das Blut vor Gerinnung schützen und als Standard in der Laboratoriumsmedizin eingesetzt werden, setzen eine Weiterverarbeitung innerhalb von 4 Stunden voraus. Ansonsten zerstört die einsetzende Zelllyse die CTCs und Leukozyten. Das führt neben dem Verlust der CTCs zu einem extrem starken Anstieg der zellfreien DNA im Plasma und erschwert die Detektion der ctDNA zusätzlich. Die erforderliche schnelle Bearbeitung der Proben ist jedoch in der Realität in der klinischen Diagnostik nicht umzusetzen.

Speziell entwickelte Röhrchen für die CTC-Analyse ermöglichen eine Stabilisierung des Blutes über einen Zeitraum von bis zu fünf Tagen bei Raumtemperatur. Dies erlaubt den Probenversand bei multizentrischen Studien und macht Analysen in einem spezialisiertem Zentrallabor möglich.

Limitiertes Probenmaterial sowie die Anforderung an ein möglichst unkompliziertes Blutentnahme-Verfahren in der Routine, setzen eine gleichzeitige CTC- und ctDNA-Gewinnung aus derselben Probe voraus. Eine gleichzeitige Gewinnung von CTCs und ctDNA, wie z.B. bei EDTA-Blut ist möglich, bei blutstabilisierenden Röhrchen in der Regel aber nicht vorgesehen.

Eine weitere Limitierung ist die Fixierung der Zellen durch die Spezialröhrchen. Sie führt dazu, dass die gegebenenfalls vorhandenen CTCs für die RNA-Analyse und Kultivierung / *in vivo*-Tierversuche nicht mehr geeignet sind, da sie die Fixierung nicht überstehen. Außerdem ist noch nicht ausreichend bekannt, ob die Beschichtungen Wechselwirkungen mit den CTCs und der ctDNA eingehen und ob diese Auswirkungen auf die Analyse haben.

DNA-Isolierung

Die ctDNA-Isolierung, die als Fraktion der gesamten zellfreien DNA (cfDNA) aus dem Plasma isoliert wird, erfolgt nach standardisierten Protokollen. Für eine weiterführende molekulargenetische Analyse, wie zum Beispiel NGS-basierte Verfahren, sollten in der Regel 3 ng DNA eingesetzt werden. Diese Menge wird in der Realität aufgrund der oben beschriebenen Probleme oft nicht erreicht. Weiterhin ist es nicht garantiert, dass sich ctDNA unter der cfDNA befindet.

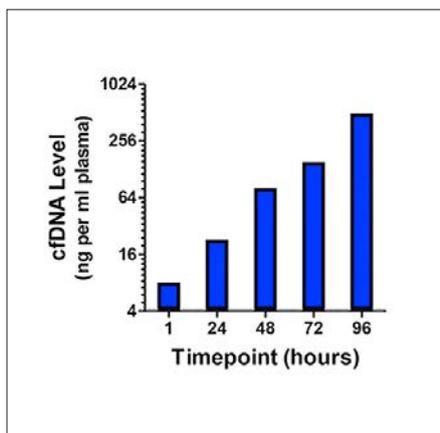


Abb.1: cfDNA-Level aus 20 HNV (Gesunder Freiwilliger) Blutproben in EDTA Röhrchen [2]. ©Wiley, Molecular Oncology 2015

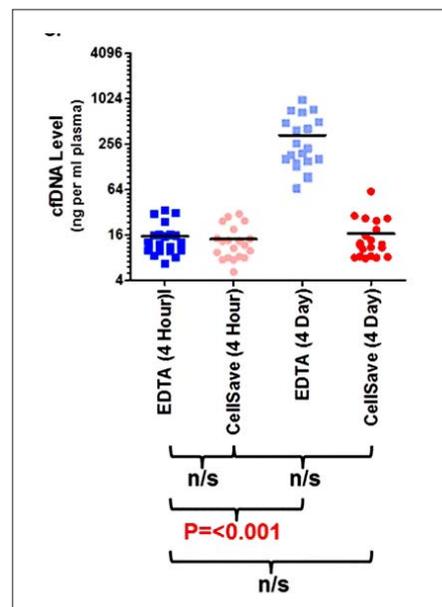


Abb.2: cfDNA-Level in Cellsearch Cellsave-Röhrchen und in EDTA-Röhrchen im Vergleich [2] ©Wiley, Molecular Oncology 2015

Fazit

Die Präanalyse von CTCs und cfDNA ist schon in den ersten Schritten der Proben-gewinnung durch die vielen limitierenden Faktoren nicht einfach durchzuführen. Dadurch ist das System der Liquid Biopsy extrem anfällig für Fehler und Fehlinterpretationen. Zurzeit besteht noch eine große Lücke zwischen der Grundlagenforschung an CTCs / ctDNA und der Entwicklung von belastbaren Assays für den Einsatz in der klinischen Diagnostik. Das europäische Cancer-ID IMI Konsortium (www.cancer-id.eu) befasst sich mit Etablierung und Standardisierung der CTC- und ctDNA-Analysen. Bis 2020 sollen Verfahrensleitungen (SOPs) für Präanalytik, Analytik, und für die bioinformatische Auswertung erarbeitet werden, um ein international einheitliches Handling von Liquid Biopsies möglich machen.

Zugehörigkeiten

¹Life Sciences - PR, Kalbe

²Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Tumorbiologie, Hamburg



KONTAKT |

Anne Wesche
Dipl.-Biol. & PR-Fachreferentin
Life Sciences PR
Kalbe
aw@lifesciences-pr.de



Weitere Beiträge zur Diagnostik:
<http://bit.ly/GIT-Dia>



Referenzen:
<http://bit.ly/GIT-Wesche>