

Management & Krankenhaus

Zeitung für Entscheider im Gesundheitswesen

WILEY

Was kann „Liquid Biopsy“ heute schon leisten?

Nach der ersten Beschreibung extrazellulär vorliegender Nukleinsäuren im humanen Plasma durch Mandel und Metais im Jahr 1948 vergingen fast 30 Jahre, bevor das Potential, das diese Entdeckung mit sich bringt, voll erkannt wurde.

Dr. Michael Fleischhacker, Klinik für
Innere Medizin, DRK Kliniken Berlin

Die technischen und methodischen Entwicklungen zur molekularen Charakterisierung von DNA und RNA, hier vor allem die traditionelle PCR, ihre Weiterentwicklung zur digitalen PCR und die Hochdurchsatzsequenzierung, führten dazu, dass es möglich ist, geringste Nukleinsäuremengen mit hoher Sicherheit darzustellen. Bereits heute ist eine Analyse von fötalen Nukleinsäuren, die aus dem Blut schwangerer Frauen gewonnen werden, in der klinischen Routine angekommen. Mit einer einfachen Blutentnahme im ersten Trimenon der Schwangerschaft können genetische Veränderungen des ungeborenen Kindes oder kindliche Erkrankungen im mütterlichen Blut erkannt werden. Die komplexe Methode zur Charakterisierung extrazellulärer Nukleinsäuren (als Synonym für zellfreie Nukleinsäuren) wird seit kurzem unter dem Sammelbegriff „Liquid Biopsy“ zusammen gefasst.

Anwendungsmöglichkeiten der Liquid Biopsy

Seit wenigen Jahren werden diese Untersuchungen nicht nur in der Pränataldiagnostik, sondern



auch in der Versorgung von Tumorpatienten eingesetzt. So bieten z. B. Firmen in Deutschland und den USA Kits an, mit deren Hilfe die frühzeitige Diagnose eines kolorektalen Tumors anhand einer Blutprobe möglich ist. Dabei werden die im Blutplasma vorhandenen zellfreien (d.h. extrazellulären) Nukleinsäuren isoliert und auf das Vorliegen von Tumor-assoziierten Markern (Mutationen verschiedenster Art bzw. epigenetische Veränderungen wie z.B. die Methylierung von Cytosin) untersucht. Bei einem positiven Ergebnis der Liquid Biopsy, die in diesem Zusammenhang eine Screeningmethode ist, wird der sichere Nachweis eines kolorektalen Tumors durch die pathologische Begutachtung einer koloskopisch gewonnenen Gewebebiopsie erbracht.

Eine weitere Anwendung der Liquid Biopsy ist das real-time Monitoring von Lungentumorpatienten unter oder nach Therapie. Dabei werden während der Therapie sequentielle Blutproben von den Patienten entnommen und die extrazelluläre Plasma-DNA auf das Vorhandensein von Tumor-assoziierten Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert (prä-Therapie) untersucht. Unter Verwendung einer real-time PCR zum

quantitativen Nachweis methylierter SHOX2 Plasma-DNA konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Ansprechen auf eine medikamentöse Tumorthherapie bereits 1 bis 2 Wochen nach Beginn der Therapie – und damit wesentlich früher als durch eine Computertomographie – feststellbar ist. Wenn sich diese Befunde in weitergehenden Untersuchungen bestätigen lassen, könnte in Zukunft entweder frühzeitig ein Therapiewechsel oder ein Abbruch der Therapie in Erwägung gezogen werden.

Verbesserte Lebensqualität der Patienten

Im Sinne der Patienten könnten hierdurch die Wirksamkeit der Behandlung erhöht und die unerwünschten therapiebedingten Effekte, wie Verschlechterung der Lebensqualität und Nebenwirkungen der Therapie, vermindert werden. Die Patienten, bei denen eine aktivierende Mutation des EGFR Gens nachweisbar ist (Prävalenz ca. 12% in Europa), erhalten anstelle einer Platinbasierten Standard-Chemotherapie eine Therapie mit einem Inhibitor der Tyrosinkinase (wie

z. B. Afatinib, Erlotinib oder Gefinitib). Eine TKI Therapie verlängert bei diesen Patienten nicht nur die Überlebenszeit, sondern ist oft mit einer verbesserten Lebensqualität verbunden (verglichen mit einer Standard-Chemotherapie). Leider entwickeln die Tumore aller Patienten früher oder später eine Resistenz gegen die eingesetzten TKIs. Das führte zur Entwicklung von Substanzen, die als zweite (Afatinib, Dacomitinib) bzw. dritte Generation (Osimertinib) von TKI bezeichnet werden und diese Resistenz durchbrechen können. Die Entwicklung einer Therapieresistenz ist häufig mit einer Alteration in den Codons L858R, T790M, und/oder C797S des EGFR Gens assoziiert. Die Europäische Zulassungsbehörde hat 2016 Osimertinib zur Behandlung von EGFR T790M Mutations-positiven metastatischen NSCLC Patienten zugelassen. Diese beinhaltet auch die Möglichkeit, bei einer fehlenden Gewebeanalyse (schwierige Tumorlokalisation, ältere/multimorbide Patienten, zu hohes Risiko für die Gewinnung einer Biopsie), extrazelluläre Plasma-DNA zur Bestimmung des EGFR Status einzusetzen. Damit ist es bereits heute möglich, den Patienten, deren Tumor eine Resistenz gegen TKIs der ersten/zweiten Generation entwickelt hat, eine Behandlung mit Osimertinib anzubieten. In den letzten Jahren konnte auch gezeigt werden, dass mit der real-time Analyse der Plasma-DNA ein Tumorprogress schneller sichtbar gemacht werden kann, als mit einem bildgebenden Verfahren. Ob ein zeitnahe Therapiewechsel alleine auf der Basis der durch Liquid Biopsy erhobenen

Befunde für die Patienten von Vorteil ist, muss in weitergehenden Studien untersucht werden.

Schwierige Präanalytik

Für die Gewinnung der Plasmaproben, die für o.g. Analysen eingesetzt wurden, waren in der Mehrzahl der Untersuchungen herkömmliche EDTA Röhrrchen das Mittel der Wahl. Allerdings wurde in mehreren Studien gezeigt, dass sich die Menge und die Zusammensetzung der zellfreien DNA verändert, wenn das Blut in den EDTA Röhrrchen über eine längere Zeit (> 6 h nach Blutentnahme) bei Umgebungstemperatur gelagert wird. Dieser Effekt beruht auf der Lyse von Blutzellen, die ihre genomische DNA freisetzen und damit das Verhältnis von genomischer zu extrazellulärer DNA zugunsten der ersteren verschieben. Das bedeutet, dass die Plasmaseparation (in der Regel eine mehrmalige Zentrifugation zur Abtrennung der Blutzellen) kurz nach Blutentnahme durchgeführt werden muss.

Spezielle Blutentnahmeröhrrchen für Liquid Biopsy

Damit werden multizentrische Studien, die für die Etablierung eines Standards bzgl. der prä-analytischen Prozesse essentiell sind, sehr schwierig. Um dieses Problem zu umgehen, bieten seit kurzem mehrere Firmen spezielle Blutentnahmeröhrrchen für die Liquid Biopsy an, die eine mehrtägige Lagerung (und damit

auch eine postalische Versendung bei Raumtemperatur) erlauben. Durch die Zugabe proprietärer Substanzen werden die hämatopoetischen Zellen in den Blutentnahmeröhrrchen stabilisiert, so dass sie nicht lysieren und eine „Kontamination“ der zellfreien DNA verhindert wird. Wir haben vor kurzem EDTA Blutentnahmeröhrrchen und die PAXgene ccfDNA Röhrrchen (Qiagen / BD) miteinander verglichen. Wenn die Plasmaproben aus beiden Röhrrchen am Tag der Blutentnahme gewonnen werden, ist die Menge an zellfreier DNA vergleichbar. Dagegen führte eine 7-tägige Lagerung der Blutproben in den EDTA Röhrrchen zu einem starken Anstieg an zellfreier DNA, nicht aber in den ccfDNA Röhrrchen. Das gilt sowohl für die Gesamtmenge an DNA als auch für die Menge an methylierter DNA (mSHOX2).

Mit diesen Untersuchungen sind die ersten Schritte zur Entwicklung und Etablierung eines Standards für die Gewinnung von Blutproben, die anschließend mittels Liquid Biopsy analysiert werden, möglich geworden. Weitere Studien unter Einschluss einer größeren Anzahl von Patienten sind aber notwendig, um die bisher erhobenen Befunde zu bestätigen. Erst danach kann über den Einsatz dieser speziellen Blutentnahmeröhrrchen in der klinischen Routine für diese Anwendung entschieden werden. Die Bibliographie zu diesem Artikel kann beim Autor erfragt werden.

Dr. Michael Fleischhacker
Universitätsklinikum Halle/Saale
m.fleischhacker@drk-kliniken-berlin.de
www.drk-kliniken-berlin.de