

Flüssigbiopsie und NGS: eine neue Dimension translationaler klinischer Forschung

Zellfreie DNA hat das Potenzial, das Rätsel der Tumorerheterogenität zu lösen.

Einleitung

Zellfreie DNA (Cell-free DNA, cfDNA) im Blutkreislauf kann von unterschiedlichen Gewebearten, Tumoren und Mikroorganismen im Körper stammen. Die Flüssigbiopsieanalyse von cfDNA im Blut eignet sich bestens zur Diagnose und Überwachung bestimmter Erkrankungen wie beispielsweise Krebs.

Tumore setzen u. U. eine signifikante Menge DNA frei. Die von abgestorbenen Tumorzellen freigesetzte DNA wird als zirkulierende Tumor-DNA (Circulating Tumor DNA, ctDNA) bezeichnet und bildet einen kleinen Teil der cfDNA im Blut. Aus diesem Grund muss ein robuster Assay zur Bestimmung seltener somatischer Mutationen zur Verfügung stehen.

Verfahren der Sequenzierung der nächsten Generation (Next-Generation Sequencing, NGS) ermöglichen die hochgradig sensitive und spezifische Bestimmung bekannter Mutationen. In jüngster Zeit befinden sich umfassende Assays zur Analyse eines größeren Bereichs von Genkandidaten und Variantentypen für neue Tumoren ohne bekannte Varianten in Entwicklung. Mit der Weiterentwicklung dieser Verfahren gewinnt die ctDNA-Analyse für zahlreiche Anwendungsbereiche an Bedeutung, darunter Screening, Therapieauswahl, Überwachung und Ermittlung von Therapieresistenz als Methode zur Überwachung des Krankheitsverlaufs.

Vorteile der Flüssigbiopsie im Vergleich zur Gewebebiopsie

Da die Probenentnahme praktisch nichtinvasiv erfolgt, sind Flüssigbiopsien besonders nützlich, wenn das Gewebe von Interesse nicht zugänglich ist. Selbst wenn abgestorbenes Gewebe zugänglich ist, sind wiederholte Biopsien bei zahlreichen Erkrankungen zur Überwachung angezeigt. Hierbei bietet die cfDNA-Analyse zahlreiche Vorteile.

Die Probenentnahme bei Flüssigbiopsien kann über eine herkömmliche Blutentnahme erfolgen, für die kein Spezialist erforderlich ist. Eine Gewebebiopsie muss dagegen durch speziell qualifiziertes Fachpersonal bzw. durch Chirurgen erfolgen. Im Hinblick auf diesen grundlegenden Schritt ist die Flüssigbiopsie wesentlich kostengünstiger sowie schneller und sie weist ein geringeres Risiko für unerwünschte Ereignisse auf.

Nach der Probenentnahme erfolgt die für die cfDNA-Analyse optimierte DNA-Extraktion schneller und kostengünstiger als beim Umgang mit FFPE-Proben (formalinfixiert, in Paraffin eingebettet). Die mangelnde Zugänglichkeit bestimmter Gewebe stellt bei Gewebebiopsien eine deutliche Einschränkung für Erstuntersuchungen sowie wiederholte Biopsien dar. Die überarbeiteten Richtlinien des National Comprehensive Cancer Network (NCCN) empfehlen für bestimmte Tumorarten die Flüssigbiopsie, insbesondere bei Fällen, bei denen keine Gewebebiopsie möglich ist, beispielsweise bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen.¹

Obwohl ctDNA aus einer spezifischen Gewebequelle nur einen kleinen Anteil der gesamten cfDNA bildet, hat sich die cfDNA-Analyse zu einem verfeinerten Werkzeug zur Beurteilung der Tumorerheterogenität entwickelt und reduziert Fehler bei der Probenentnahme. Die ctDNA-Analyse eignet sich zur Überwachung des Krankheitsverlaufs sowie des Behandlungserfolgs. Mit Sequenzierungsverfahren, mit denen neue Mutationen bestimmt werden können, lässt sich die Flüssigbiopsie besonders effektiv zur Überwachung einer aufgrund neuer Veränderungen erworbenen Resistenz einsetzen. Dank der zunehmenden Sensitivität und der Entwicklung von Assays, mit denen sich zahlreiche Gene gleichzeitig untersuchen lassen, eignet sich cfDNA für das umfassende Tumor-Profilierung (Abbildung 1). Hierbei lassen sich mithilfe der Flüssigbiopsie während des Krankheitsverlaufs neue Mutationen ermitteln sowie Mutationen, die in neuem Gewebe außerhalb der ursprünglichen Tumorquelle entstehen.

Technologien für die Analyse von ctDNA

Die am häufigsten eingesetzten Verfahren zur Analyse von cfDNA sind quantitative PCR (qPCR), digitale Tröpfchen-PCR (droplet digital PCR, ddPCR) und NGS. Beide PCR-Verfahren erfordern spezifische DNA-Proben für das Targeting spezifischer Gene und geben eine quantitative Messung der Anzahl der Targets in der Probe aus. NGS erfordert ebenfalls Sonden für die Erfassung spezifischer DNA-Fragmente, jedoch besteht die Datenausgabe aus einer Sequenz der erfassten DNA.

qPCR: qPCR ist bei der Analyse einer geringen Anzahl von Varianten effizient. Jedoch sind qPCR-Assays auf relativ wenige spezifizierte Targets beschränkt und untersuchen ausschließlich spezifizierte Variantentypen. Folglich ist die Erkennungsleistung gering.

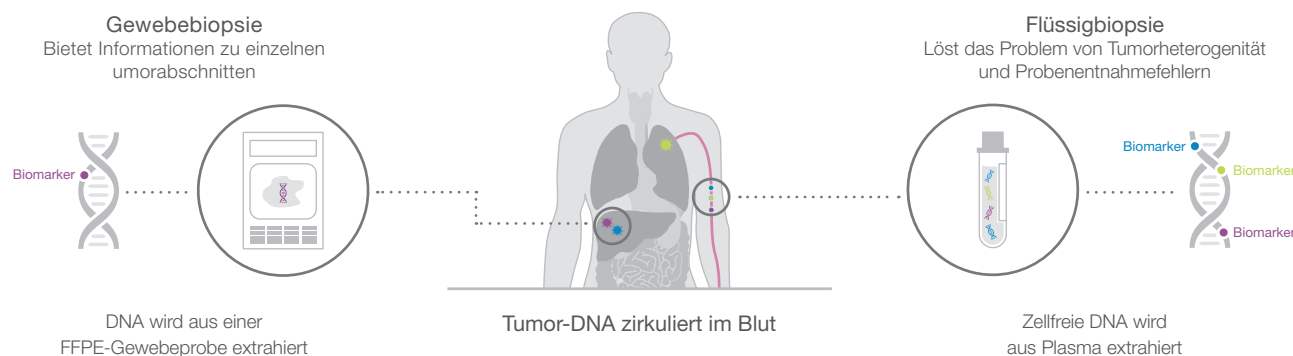


Abbildung 1: Neue molekulare Verfahren eignen sich für die Untersuchung zahlreicher Gewebe und Biomarker aus Plasmaproben – umfassendes genomisches Profiling mit cfDNA fasst Hunderte Marker in einem einzigen Assay zusammen.

Tabelle 1: Vergleich von PCR und zielgerichteter NGS

Methoden	Vorteile	Herausforderungen
PCR	Hohe Sensitivität Vertrauter Workflow Ausstattung in den meisten Labors bereits vorhanden	Ermöglicht nur die Untersuchung weniger Varianten bei geringer Auflösung Praktisch keine Erkennungsleistung Geringe Skalierbarkeit aufgrund wachsender Anforderungen an die Probeneingabe
Gezielte NGS	Größere Sequenzierungstiefe für höhere Sensitivität (bis zu nur 0,5 %) Höhere Erkennungsleistung, ideal bei Tumorerheterogenität Höhere Variantenaufklärung Höherer Probendurchsatz durch Proben-Multiplexing	Bei der Sequenzierung einer geringen Anzahl von Targets (< 20) teurer Bei der Sequenzierung einer geringen Anzahl von Targets (< 20) zeitaufwendiger

ddPCR: ddPCR ist genauer als qPCR, jedoch ist das Verfahren auch teurer und es erfordert mehr qualifizierte Fachkräfte. ddPCR weist ebenfalls eine geringe Entdeckungsleistung auf, da die Anzahl der Targets und Variantentypen auf das Design des spezifischen Assays beschränkt ist.

NGS: Da NGS DNA-Sequenzen mit Einzelnukleotidaufklärung verarbeitet, lassen sich auch neue Varianten entdecken, die nicht bereits im Assay-Design vorgesehen sind. Dies ermöglicht die Untersuchung zahlreicher Variantentypen und die Entdeckung von Mutationen an einem neuen Genlocus. NGS ist bei der Analyse einer geringen Anzahl von Varianten oder Proben teurer und zeitaufwendiger. Jedoch bietet der umfassende Ansatz der NGS Effizienz- und Kostenvorteile, wenn Assays für mehr molekulare Targets erstellt werden (Tabelle 1).

Vorteile von NGS für die Flüssigbiopsie

NGS sequenziert Millionen von DNA-Fragmenten gleichzeitig, gefolgt von einem computergestützten Alignment der Reads zum Genom. Abhängig vom Assay-Design ist NGS besonders umfassend und deckt eine große Anzahl von Gen-Targets sowie Variantentypen ab. Vor dem Hintergrund der wachsenden Anzahl zu untersuchender Biomarker bei der Krebsbehandlung verspricht die Zusammenfassung einer großen Anzahl von Biomarkern in einem Test Vorteile für die Forschung und den klinischen Einsatz gleichermaßen, da für aussagekräftige Ergebnisse weniger Tests durchgeführt werden müssen. NGS bietet das Potenzial zur Einsparung von Proben, Zeit und Geld, da wiederholte Tests entfallen.

Verfahren für die Bibliotheksvorbereitung für die Sequenzierung wie Hybridisierungsschemie ermöglichen die Extraktion großer Fragmente der Gene von Interesse aus den cfDNA-Proben. Hybridisierungssonden lassen sich mit einer Größe erstellen, bei der Targets selbst bei Vorliegen von Mutationen in den hybridisierten Regionen erfasst werden. Die nachfolgende Sequenzierung erfasster Targets ermöglicht die Entdeckung neuer Mutationen, die beim Assay-Design nicht bekannt waren. NGS-Assays lassen sich entweder für das Targeting einer großen Anzahl von Genen bei geringer Sequenzierungstiefe auslegen (umfassender, weniger sensitiv) oder für eine relativ geringe Anzahl von Genen bei höherer Sequenzierungstiefe (weniger umfassend, sensitiver). Aufgrund des möglicherweise geringen ctDNA-Anteils in cfDNA-Proben für die Flüssigbiopsie ist eine hohe Sequenzierungstiefe erforderlich, um Varianten mit geringer Häufigkeit genau bestimmen zu können. Aus diesem Grund war, obwohl NGS-Gen-Panels mit umfassendem Inhalt vorhanden sind, der Einsatz bei der Flüssigbiopsie aufgrund der mangelnden Sensitivität bis vor Kurzem beschränkt.

NGS ermöglicht umfassendes genomisches Profiling

Aktuelle Fortschritte bei Sequenzierungstechnologien bieten Möglichkeiten zur Sequenzierung von Proben mit extrem hoher Coverage-Tiefe für große Teile des Genoms in einer einzigen Probe. Der umfassende Ansatz in Kombination mit der hohen Sensitivität

und Spezifität von NGS ermöglicht die Analyse Hunderter Gene mit der für die cfDNA-Analyse erforderlichen Sequenzierungstiefe. Diese Eigenschaften ermöglichen wiederum die Untersuchung einer großen Anzahl bekannter Mutationen sowie die Entdeckung neuer Treibermutationen in der Krebsforschung. Neue verfügbare molekulare Werkzeuge und Bioinformatikverfahren erhöhen die Genauigkeit. Eindeutige molekulare Identifikatoren (Unique Molecular Identifiers, UMIs) lassen sich in die DNA-Bibliotheksvorbereitung integrieren, um einzelne DNA-Moleküle vor den Amplifikationsschritten zu markieren und später während der Datenanalyse zur Bestimmung von PCR-Fehlern zu verwenden. Differenzierte Algorithmen ermitteln Sequenzierungsartefakte und verhindern das Fehler generierende Hintergrundrauschen, was die Bestimmung echter Varianten mit hoher Spezifität ermöglicht.

Die Flüssigbiopsie in Kombination mit umfassenden molekularen Assays zur Bestimmung somatischer Varianten ermöglicht die Entdeckung neuer Mutationen, die während der Tumorentwicklung entstehen, sowie von Arzneimittelresistenzen und Metastasen. Krebs ist eine unberechenbare Erkrankung, bei der die Treibergene nicht immer bekannt sind bzw. nicht für jeden Gewebetyp richtig erkannt werden. Mit der Möglichkeit, zahlreiche Gene und Gewebe gleichzeitig zu untersuchen, bieten die Synergieeffekte bei der Flüssigbiopsie mit umfassendem genomischen Profiling auf NGS-Basis große Vorteile. Aktuelle Vergleichsstudien mit Flüssigbiopsien und entsprechenden Gewebebiopsien haben gezeigt, dass die cfDNA-Analyse beim Einsatz umfassender Assays deutlich mehr in Richtlinien empfohlene Biomarker und Resistenzänderungen erkennt als die entsprechenden Gewebebiopsien.^{2,3}

Zusammenfassung

Die wachsende Anzahl der Biomarker in der Präzisionsmedizin sorgt für ein ebenso wachsendes Interesse an molekularen Verfahren, mit denen sich zahlreiche Biomarker in einem Test zusammenfassen lassen. Auf der anderen Seite haben Studien gezeigt, dass die Flüssigbiopsie mit ihrem umfassenderen Überblick über die Tumorentwicklung wertvolle Informationen zu bestimmten Tumorarten liefern kann, die bei der lokalen Gewebebiopsie mitunter nicht erfasst werden. Mit den aktuellen Fortschritten bei der NGS-Technologie lassen sich beide dieser Ziele erreichen, da diese Technologie ein umfassendes genomisches Profiling mit der für Flüssigbiopsieanwendungen erforderlichen Sensitivität und Spezifität ermöglicht.

Quellen

1. NCCN Guidelines. www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. Aufgerufen am 13. Dezember 2018.
2. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med.* 2019;25(9):1415–1421.
3. Leigh NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4691–4700.

illumina • 1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) • +1.858.202.4566 (Tel. außerhalb der USA) • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Weitere Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html. 1170-2020-002-A DEU QB9356

