

# Diagnostik mit Hilfe von zellfreier, zirkulierender DNS aus Blut: Auf dem Weg in die Routine-Diagnostik?

Dr. Thorsten Voss

Zellfreie, zirkulierende DNS oder im Englischen „cell-free circulating DNA“ (abgekürzt ccfDNA) aus Blutplasma oder -serum wird zu einer immer wichtigeren Säule der molekularen Diagnostik. Sie wird als ein Weg gesehen, durch aufwendige und belastende operative Eingriffe gewonnene Biopsien durch eine einfache Blutentnahme, also eine nicht-invasive Gewinnung der diagnostischen Probe zu ersetzen oder zu ergänzen. Daher möchte ich zunächst die Hintergründe zu diesem neuen diagnostischen Werkzeug erläutern und dann auf einige entscheidende Aspekte für die praktische Anwendung eingehen.

Seit Mitte des vorigen Jahrhunderts ist bekannt, dass in Blutplasma generell freie, d. h. nicht an Zellen gebundene DNS vorkommt, wenn auch nur in sehr geringer Menge von wenigen Nanogramm pro Milliliter. Auch die Erkenntnis, dass bei manchen Krankheiten – insbesondere bei bestimmten Tumoren – die Menge dieser DNS im Plasma teilweise stark ansteigt, stammt schon aus den 60er- und 70er-Jahren. Es dauerte allerdings bis in die 90er-Jahre, bis erste Forscher erkannten, dass diese DNS als Werkzeug für die molekulare Diagnostik genutzt werden kann. Bahnbrechend war zum einen der Nachweis von tumorspezifischen Mutationen in dieser DNS und zum anderen die Feststellung, dass bei schwangeren Frauen auch die DNS des Fötus in der zirkulierenden DNS zu finden ist<sup>1</sup>.

Diese fötale DNS ist die Basis für die mittlerweile oft genutzte, nicht-invasive Pränataldiagnostik, häufig abgekürzt als NIPT („non-invasive prenatal testing“). Hierbei ist „nicht-invasiv“ im Gegensatz zu der bisherigen Standardmethode der Amniozentese (Fruchtwasseruntersuchung) zu verstehen, die ein nicht zu unterschätzendes Risiko für den Fötus mit sich bringt<sup>2,3</sup>. Beim NIPT werden durch ein hochsensibles Verfahren (in den meisten Fällen wird hier eine hochauflösende Sequenzierungs-Technik, genannt „Next Generation Sequencing“ [NGS], verwendet) die aus dem Plasma gewonnenen fötalen DNS-Stücke den verschiedenen Chromosomen zugeordnet. Da die zu erwartende Anzahl dieser Stücke bei der normalen Chromosomenzahl bekannt ist, kann bei abweichenden Zahlen auf eine entsprechende Anomalie geschlossen werden. So ist eine frühzeitige Erkennung von Trisomien der Chromosomen 21, 13 und 18 oder auch eines Turner-Syndroms – hier liegt bei weiblichen Föten nur eines anstelle von zwei X-Chromosomen vor – möglich. Im deutschsprachigen Raum wird diese Art der Diagnostik von mehreren Anbietern sehr zuverlässig innerhalb von ein bis zwei Wochen durchgeführt (z. B. PraenaTest®, HarmonyTest® oder Panorama Test®).

Ein weiteres Feld, in dem die Verwendung von zirkulierender DNS immer wichtiger wird, ist die Diagnose und Therapiebegleitung von Tumorerkrankungen. Wie oben erwähnt, ist schon lange bekannt, dass tote und sterbende Tumorzellen fragmentierte DNS in die Blutbahn abgeben. Dies geschieht vor allem über zwei Prozesse: zum einen über die Apoptose, den gerichteten Zelltod, und zum anderen über nekrotische, also ungerichtete Absterbeprozesse des Tumorgewebes. Apoptose findet ständig in allen Geweben statt, wohingegen nekrotische Prozesse vor allem durch entsprechende Therapien mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung ausgelöst werden<sup>4</sup>. Über die aus dem Plasma isolierte Tumorzell-DNS und die auf ihr kodierten tumorspezifischen Informationen können nun verschiedene klinische Aussagen abgeleitet werden: Im Rahmen von Früherkennungsprogrammen können Tumoren auch in sehr frühen Stadien nachgewiesen werden, wodurch sich die Heilungschancen deutlich verbessern. Dies ist beispielsweise für Darmkrebs mit kommerziellen Tests bereits möglich (z. B. Epi proColon®). Außerdem kann im Rahmen einer Therapiebegleitung der Erfolg einer Behandlungsmethode einfacher quantifiziert werden als z. B. über bildgebende Verfahren. Von großer Bedeutung ist auch, dass eine Rückkehr der Erkrankung sehr früh festgestellt werden kann (z. B. Colvera™). Durch die Analyse der in der zirkulierenden Tumorzell-DNS gefundenen Mutationen kann zudem auch die Wirksamkeit einiger Medikamente vorab beurteilt werden und so eine eventuell sinnlose Therapie vermieden werden.

Neben diesen beiden zur Zeit wichtigsten Anwendungen von zellfreier, zirkulierender DNS gibt es noch weitere Felder, in denen sich ein Einsatz abzeichnet, zum Beispiel bei Organerkrankungen wie Diabetes oder auch bei der Begleitung von Patienten, die eine Organtransplantation erhalten haben.

Zellfreie, zirkulierende DNS kann also wie beschrieben ein sehr hilfreicher Analyt in verschiedensten Bereichen sein. Allerdings sind hierfür einige technische Rahmenbedingungen entscheidend, die insbesondere mit der Entnahme, dem Transport bzw. der Lagerung der Proben sowie der Aufarbeitung der DNS verknüpft sind. Diese Arbeitsschritte vor dem eigentlichen Test werden auch als Präanalytik bezeichnet. Aufgrund der Wichtigkeit der Präanalytik wurde von der EU ein entsprechender technischer Labor-Standard für die auf zellfreier, zirkulierender DNS basierende Diagnostik definiert<sup>5</sup>.

Die zellfreie, zirkulierende DNS kommt nur in sehr geringen Mengen im Plasma vor. Damit diese Ziel-DNS von



# Fortsetzung... Diagnostik mit Hilfe von zellfreier, zirkulierender DNS aus Blut: Auf dem Weg in die Routine-Diagnostik?

►► den sehr empfindlichen Analyse-Methoden nachgewiesen werden kann, ist es essenziell, dass sie nicht durch DNS aus den Blutzellen überlagert oder verdünnt wird. Die Blutzell-DNS enthält die krankheitsrelevanten Informationen nicht und macht eine Bestimmung der Chromosomenhäufigkeit schnell unmöglich. Schon direkt nach der Blutentnahme, z. B. in ein Standard-Röhrchen mit Blutgerinnungshemmer (EDTA-Röhrchen), beginnen die weißen Blutzellen abzusterben und ihre DNS in das Plasma abzugeben. Dieser Prozess beschleunigt sich noch, wenn die Blutproben vor der weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur oder bei höheren Temperaturen gelagert oder zum Analyselabor transportiert werden müssen. Zudem beginnen im Laufe der Zeit auch die roten Blutzellen zu lysieren. Diese enthalten zwar keine DNS, aber durch die steigende Rotfärbung des Plasmas wird es immer schwieriger, das Plasma von den Zellen abzutrennen. Zudem schwellen alle Zellen mit der Zeit deutlich an. So verringert sich die Ausbeute an Plasma deutlich. Da die Ziel-DNS-Moleküle nur in sehr geringen Mengen vorliegen, werden für viele Tests große Mengen an zellfreiem Plasma benötigt.

Um diesen Prozessen entgegenzuwirken, haben verschiedene Hersteller Blutentnahme-Röhrchen entwickelt, die die Blutzellen stabilisieren und so verhindern, dass sie ihre DNS in das Plasma abgeben. Diese Röhrchen ermöglichen die Lagerung und den Transport von Blutproben bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen über mehrere Tage. Dieser Effekt wird häufig dadurch erreicht, dass in den Röhrchen ein Reagenz vorgelegt wird, das Biomoleküle miteinander vernetzt; es kommt zu sogenannten „cross-links“<sup>6</sup>. Dadurch wird verhindert, dass die Zellmembranen der Blutzellen platzen und so die DNS aus den Zellen in das Plasma freigesetzt wird. Da diese Reagenzien aber auch andere Biomoleküle wie z. B. auch die Ziel-DNS vernetzen, kommt es bei einigen analytischen Tests zu Problemen. Diese Nachteile wurden bei der Entwicklung des neuen PAXgene® Blood ccfDNA Systems vermieden, indem eine andere Technologie verwendet wurde, die ohne vernetzende Reagenzien auskommt und sehr effektiv sowohl weiße als auch rote Blutzellen stabilisiert (Abb. 1).

Dieses System besteht zum einen aus einem Blutentnahme-Röhrchen, das - im Gegensatz zu anderen Röhrchen - aus bruchsicherem Kunststoff besteht und über einen bewährten Spritzschutz (BD Hemogard™) im Verschluss verfügt, um Kontaminationen der Umgebung mit Blut zu vermeiden. Zudem gehört zu dem System ein genau abgestimmtes und speziell für dieses Röhrchen entwickeltes Verfahren zur effizienten Aufreinigung der zellfreien, zirkulierenden DNS. Da dieses Verfahren durch einen Laborautomaten durchgeführt

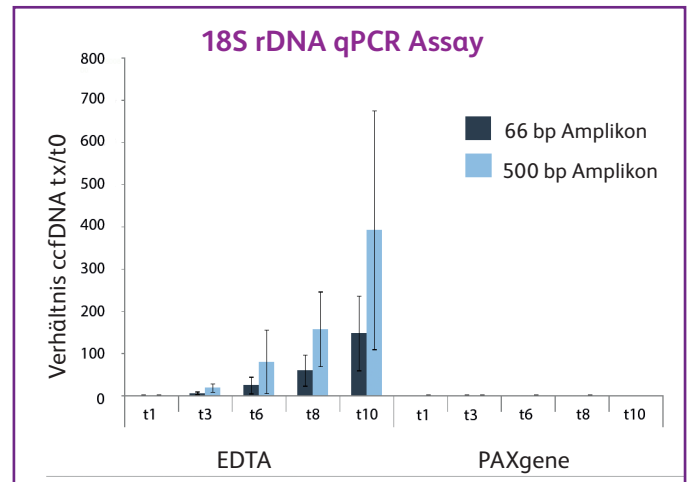


Abb. 1: PAXgene Blood ccfDNA Stabilisierung verhindert die Freisetzung von genomischer DNA aus weißen Blutzellen in das Plasma. Plasma von sechs Spendern wurde zu verschiedenen Zeitpunkten von den Blutzellen abgetrennt, die ccfDNA wurde isoliert und ihre Menge mittels „real-time PCR“ bestimmt (18S rDNA Gen, 66bp/500 bp Amplicon). t = Tage, t0 = Zeitpunkt direkt nach der Blutentnahme tx = Zeitraum der Lagerung bei Raumtemperatur. EDTA: konventionelles Blutentnahme-Röhrchen, PAXgene: PAXgene Blood ccfDNA Blutentnahme-Röhrchen.

wird, können menschliche Fehler minimiert und mehr Proben verarbeitet werden. Durch diesen hohen Grad an Standardisierung wird gewährleistet, dass es nicht zu Verlusten der wertvollen Ziel-DNS durch Fehler in der Präanalytik kommt, die die Testergebnisse negativ beeinflussen könnten.

Zusammenfassend kann klar gesagt werden, dass die Analyse von zellfreier, zirkulierender DNS, weit über die schon jetzt vorhandenen Anwendungen in der Diagnostik hinaus, in Zukunft immer wichtiger werden wird. Für immer neue Krankheitsgebiete wird hier ein Nutzen in der Wissenschaft erkannt, und die technischen Voraussetzungen für eine breitere Anwendung in der Klinik sind bereits vorhanden.

#### Literatur:

1. Lo et al. (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. The Lancet 350, 485-487.
2. Papantoniou et al. (2001) Risk factors predisposing to fetal loss following a second trimester amniocentesis. BJOG 108, 1053-1056.
3. Hochspringen et al. (2002) Zur Komplikationsrate bei invasiven, intrauterinen Eingriffen an einer pränataldiagnostischen Schwerpunktabteilung. Ultraschall in Med. 23(2), 119-122.
4. Schwarzenbach et al. (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Canc 11, 426-437.
5. CEN/TS 16835-3:2015, Europäisches Komitee für Normierung (CEN).
6. Dargestellt u. a. in den Patenten WO2013123030A2, US2011111410A1, US5460797A, US5459073A.

#### Autor:

**Dr. Thorsten Voss,**  
Senior Scientist, PreAnalytiX R&D, QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden