

*T. V. Werner, S. Laßmann, M. Werner, Institut für Klinische Pathologie, Universitätsklinikum Freiburg & Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Partnerstandort Freiburg, und Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg.*

22. März 2019

---

## Liquid Biopsy in der translationalen Pathologie – Aktuelle Herausforderungen und Potentiale

**Als minimal-invasive Untersuchung stellt die Liquid Biopsy eine Ergänzung zur Analyse von Gewebeproben für die Präzisionsonkologie dar. Zusätzliche Informationen können durch eine umfassende Darstellung des Tumormutationsprofils unter Berücksichtigung der Tumorheterogenität sowie ein frühzeitiges Monitoring des klinischen Verlaufs, wie das Auftreten einer Therapieresistenz, von Rezidiven oder den Nachweis verbleibender Tumorzellen nach Tumorresektion, erhalten werden. In der Routine sind derzeit fast ausschließlich Analysemethoden basierend auf mittels Liquid Biopsy (Flüssigbiopsie) aus Blut isolierter zellfreier DNA etabliert. Aktuelle Technologien bieten eine hohe Sensitivität für die Detektion mutierter Allele mit sehr niedrigen Allelfrequenzen sowie die Identifizierung von bisher für den Einzelpatienten unbekanntem Mutationen durch Multiplex-Analytik. Hierbei müssen auch Schritte der Präanalytik (Probenmanagement) genauer betrachtet werden, da diese die Interpretation der Testergebnisse und damit die klinische Umsetzung beeinflussen.**

In der Onkologie beschreibt der Begriff Liquid Biopsy eine auf Blut oder anderen Körperflüssigkeiten wie z.B. Urin, Pleuraflüssigkeit oder Liquor basierte Diagnostik bei Tumorerkrankungen. Die Untersuchung von durch den Tumor ins periphere Blut freigesetzten Materialien stellt hierbei derzeit den Schwerpunkt in Forschung und angewandter Diagnostik dar. Zu diesen Materialien gehören zellfreie DNA (cell-free DNA, cfDNA) und zellfreie RNA (cell-free RNA, cfRNA), zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells, CTC) sowie Exosomen (Abb. 1) (1, 2). Im Zusammenhang mit Tumoren wird die cfDNA auch öfter als ctDNA (circulating tumor DNA) bezeichnet, im Nachfolgenden wird weiterhin die Abkürzung cfDNA verwendet. Die molekulare Analyse dieser Materialien kann wichtige Zusatzinformationen zum Mutationsstatus der Tumoren liefern und damit den Verlauf einer Tumorerkrankung abbilden oder Optionen für eine zielgerichtete personalisierte Krebstherapie aufzeigen. Für die Krankenversorgung hat derzeit die Untersuchung der cfDNA mittels Liquid Biopsy die größte Relevanz in der Molekularpathologie. Im Rahmen qualitätsgesicherter Diagnostik mit zertifizierten Assays kann die Liquid Biopsy auf Basis von cfDNA aber aktuell nur für den Nachweis von tumorassozierten Primär- und Resistenzmutationen für eine zielgerichtete Krebstherapie beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) angeboten werden.

## Potential der Liquid Biopsy

Derzeit stellt die auf Tumorgewebe basierte molekularpathologische Diagnostik zur Bestimmung des Tumormutationsprofils den Goldstandard dar. Insbesondere für Verlaufskontrollen sind wiederholte invasive Eingriffe zur Gewinnung von Gewebe aus Lokalrezidiven oder Fernmetastasen für den Patienten belastend oder auch abhängig vom allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten bzw. der Tumorlokalisierung nicht möglich. Die Liquid Biopsy bietet im Gegensatz hierzu den Vorteil einer minimal-invasiven Methode, die in regelmäßigen Zeitabständen wiederholt werden kann. Überwiegend wird in der molekularpathologischen Diagnostik die aus dünnen Schnitten Formalin-fixierter und Paraffin-eingebetteter (FFPE) Gewebeproben isolierte DNA oder RNA verwendet. Ein solcher Schnitt repräsentiert nur einen begrenzten Bereich der Tumoraläsion. Es wird angenommen, dass eine Liquid Biopsy auch die interindividuelle und intratumorale Tumorheterogenität widerspiegelt. Grundsätzlich findet sich im peripheren Blut cfDNA und cfRNA, die aus allen Bereichen des Primärtumors oder einer Metastase stammen kann (Abb. 1). Hierbei ist aber auch nicht sichergestellt, ob wirklich von jeder Tumoraläsion cfDNA oder andere Materialien ins Blut abgegeben werden. Weiterhin bietet sich eine blutbasierte Liquid Biopsy als minimal-invasives Verfahren für die Bestimmung der Tumorlast im Verlaufsmoitoring an.

Abb. 1: Erfassung der Tumorheterogenität mit Hilfe der Liquid Biopsy (mod. nach (1)). Aus peripherem Blut lassen sich verschiedene Tumormaterialien wie cfDNA und cfRNA, zirkulierende Tumorzellen (CTC) oder Exosomen isolieren. Mit Hilfe PCR-basierter Methoden oder des NGS können diese auf tumorspezifische Mutationen untersucht werden.

Abb. 1: Erfassung der Tumorheterogenität mit Hilfe der Liquid Biopsy (mod

Image not found or type unknown

In aktuellen Studien wurde gezeigt, dass das Verfahren der Liquid Biopsy als ergänzende Untersuchungsmethode zur Gewebebiopsie großes Potential hat (1-3). Für die klinische Umsetzung müssen jedoch noch allgemeine Standards und Maßnahmen der Qualitätssicherung für die Diagnostik mittels Liquid Biopsy definiert werden (1-4).

## Bedeutung der Präanalytik

Für eine sichere molekularpathologische Diagnostik mittels Liquid Biopsy ist es wichtig, aus dem Patientenmaterial ausreichend cfDNA von guter Qualität zu gewinnen (5). Hierbei sind bereits die ersten Schritte der Präanalytik, also die Blutentnahme und die zeitnahe Weiterverarbeitung der Blutprobe im diagnostischen Ablauf, entscheidend.

Das Patientenblut sollte nach Entnahme mit EDTA-Röhrchen innerhalb von 2 Stunden weiterverarbeitet und die cfDNA aus dem Plasma isoliert werden. Ansonsten besteht die Gefahr, dass sich in der Blutprobe größere Mengen genomischer DNA aus zellulären Blutbestandteilen

befinden, welche sowohl die Isolation der cfDNA als auch die anschließende molekularbiologische Untersuchung erschweren (5). Kann eine zügige Verarbeitung der Blutprobe nicht gewährleistet werden, stehen auf dem Markt Blutentnahmeröhrchen zur Verfügung, bei denen die zellulären Blutbestandteile durch konservierende Zusätze stabilisiert werden, sodass auch nach längeren Zeiträumen cfDNA guter Qualität gewonnen werden kann (6). Diese speziellen Entnahmeröhrchen werden meist von den Instituten mit molekularpathologischer Diagnostik zur Verfügung gestellt und sind gut für den Versand der Liquid Biopsy-Probe durch die Post geeignet. Auch bei einer Transportzeit von mehreren Tagen kann so noch ausreichend cfDNA guter Qualität für eine molekularpathologische Diagnostik gewonnen werden.

Da die Menge an cfDNA, die pro Milliliter Blutplasma isoliert werden kann, je nach Patient und Stadium der Tumorerkrankung deutlichen Schwankungen unterliegt, empfiehlt es sich, vom Patienten mind. 2 Röhrchen (bzw. 10-20 ml) Blut für eine Liquid Biopsy-Diagnostik zu entnehmen. So kann in den meisten Fällen gewährleistet werden, dass ausreichend cfDNA für diagnostische Assays zur Verfügung steht.

### **Techniken für die cfDNA-Analyse**

Für die Mutationsdetektion auf Basis der cfDNA kommen verschiedene PCR-basierte Techniken zur Anwendung (Abb. 1) (7). Hierzu gehören die quantitative PCR (qPCR) sowie die digitale PCR, die zur gezielten Untersuchung einzelner Hotspots in bekannten Mutationscodons oder kleineren Sequenzbereichen genutzt werden können (7). Die Sensitivität, also die Detektionsgrenze für den Anteil mutierter Allele in der cfDNA, liegt für Verfahren auf Basis der qPCR bei etwa 1%. Mit Hilfe der digitalen PCR kann eine Sensitivität von 0,1% erreicht werden. Der Vorteil von Methoden auf Basis der qPCR und digitalen PCR sind die im Verhältnis zum Next Generation Sequencing (NGS) geringeren Kosten sowie eine kurze Probenlaufzeit bis zur Diagnose. Der Nachteil ist, dass die cfDNA nur auf bereits bekannte, tumorassoziierte Mutationen getestet werden kann. Verfahren auf Basis des NGS bieten zusätzlich die Möglichkeit, bisher für den spezifischen Tumor des Patienten auch unbekannte, aber möglicherweise therapierelevante tumorassoziierte Mutationen zu identifizieren. Die Sensitivität des NGS liegt derzeit bei 0,1% mutierter Allele in der cfDNA. Die Technik bietet das Potential, die analytische Empfindlichkeit weiter zu erhöhen. Dies führt aber unvermeidlich zu einer Kostensteigerung.

### **Liquid Biopsy in der molekularpathologischen Diagnostik**

#### *Therapie des NSCLC*

Patienten mit NSCLC profitieren im Rahmen zielgerichteter Krebstherapien beim Nachweis spezifischer aktivierender EGFR (epidermal growth factor receptor)-Mutationen von einer EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI)-Therapie (8). Mit einem Anteil von 85% sind Deletionen oder Insertionen in Exon 19 oder die Punktmutation L858R in Exon 21 die häufigsten primären EGFR-Mutationen (8). Unter Therapie mit EGFR-TKI der ersten und zweiten Generation wie Erlotinib und Afatinib entstehen bei rund 50% der Patienten Resistenzmutationen gegen den Wirkstoff, am häufigsten die Punktmutation T790M in Exon 20 des EGFR-Gens. Diese Patienten können bei nachgewiesener Resistenzmutation von einer Therapie mit einem EGFR-TKI der dritten

Generation wie Osimertinib profitieren (8).

Der Nachweis dieser Mutationen für die Indikation einer EGFR-TKI-Therapie kann gemäß der S3-Leitlinie (9), sofern nicht ausreichend Gewebe für eine molekularpathologische Diagnostik vorhanden ist, das Ergebnis der Gewebebiopsie negativ bezüglich des Nachweises einer EGFR-T790M-Mutation ausfällt oder eine Gewebe-Rebiopsie nicht möglich ist, auch mittels einer Liquid Biopsy-Diagnostik an cfDNA erbracht werden.

Zu erwähnen ist, dass eine Resistenz gegen eine EGFR-TKI-Therapie auch über einen Shift des histologischen Tumorsubtyps zu einem kleinzelligen neuroendokrinen Karzinom hervorgerufen werden kann (10). Dieser Resistenzmechanismus ist nur über die histologische Untersuchung einer FFPE-Gewebeprobe nachweisbar (8, 10).

### *EGFR-Mutationsdiagnostik*

Für die molekularpathologische Diagnostik therapierrelevanter EGFR-Mutationen auf Basis von cfDNA gibt es zum aktuellen Zeitpunkt kein Standardverfahren. Auf Basis der qPCR sind auf dem Markt verschiedene Tests mit CE-IVD-Zertifizierung verfügbar. Mit dem „cobas® EGFR Mutation Test v2“ (11) kann die cfDNA aus Plasma im Rahmen einer Liquid Biopsy auf 42 relevante Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21 des EGFR-Gens untersucht werden. Der „therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ (12) deckt mit Deletionen in Exon 19 sowie den Punktmutationen T790M und L858R nur ein eingeschränktes Spektrum an EGFR-Mutationen ab. Der „QClamp® EGFR Mutation Detection Test“ (13) umfasst Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21 von EGFR.

In der Literatur wurden jedoch bereits verschiedene Resistenzmutationen gegen EGFR-TKI der dritten Generation, wie die Punktmutation EGFR-C797S, beschrieben (8). Solche seltenen, neu identifizierten, aber therapeutisch relevanten Mutationen können nicht mit bereits kommerziell verfügbaren qPCR-Assays diagnostiziert werden.

Für die molekularpathologische Diagnostik solcher bisher unbekanntten, aber therapierrelevanten Mutationen können NGS-basierte Verfahren verwendet werden. Hierfür sind auf dem Markt kommerziell verfügbare NGS-Panels wie der Oncomine™ Lung cfDNA Assay, der AVENIO ctDNA Analysis Kit oder die QIASeq™ Targeted DNA Panels erhältlich.

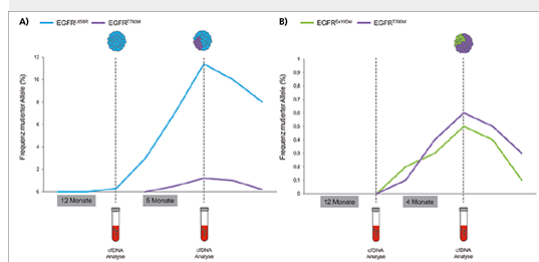
Mit Hilfe solcher NGS-Panels können neben EGFR-Mutationen auch Mutationen in weiteren mit der Tumorgenese und Progression assoziierten Genen identifiziert werden. Beim NSCLC zählen hierzu therapierrelevante Mutationen von ALK (anaplastic large cell lymphoma receptor tyrosine kinase), BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) oder auch resistenzvermittelnde Mutationen in z.B. KRAS (KRAS proto-oncogene, GTPase).

### **Fallbeispiele**

Zwei Fallbeispiele von NSCLC-Patienten sind in Abbildung 2 gezeigt. In beiden Fällen wurden nach Diagnose des Adenokarzinoms der Lunge in der FFPE-Gewebebiopsie aktivierende Primärmutationen im EGFR-Gen nachgewiesen, die eine Indikationsstellung für eine EGFR-TKI-

Therapie darstellen. In Fall 1 (Abb. 2A) die Punktmutation EGFR L858R in Exon 21, in Fall 2 (Abb. 2B) eine Deletion in Exon 19 von EGFR. Im Verlauf wurde bei beiden Patienten etwa 12 Monate nach Gewebebiopsie die erste Liquid Biopsy durchgeführt. Bei Fall 1 ist nach initialer EGFR-TKI-Therapie nur ein geringer Anteil mutierter Allele einer Tumorklone mit der EGFR-L858R-Mutation nachweisbar. Allerdings zeigt sich im Verlauf in der zweiten Liquid Biopsy 5 Monate später ein klinischer Progress, mit deutlichem Anstieg der Frequenz der Allele mit EGFR-L858R-Mutation sowie ein kleiner Anteil von Allelen mit der TKI-Resistenzmutation EGFR-T790M. In Fall 2 konnten in der ersten Liquid Biopsy im Rahmen der Detektionsgrenze keine mutierten EGFR-Allele nachgewiesen werden. Bei der zweiten Liquid Biopsy 4 Monate später sind mutierte Allele in etwa gleicher Frequenz mit EGFR Exon 19-Deletion sowie der TKI-Resistenzmutation EGFR-T790M nachweisbar. Für die Indikationsstellung einer Therapie mit dem EGFR-TKI der dritten Generation Osimertinib bedeutet dies für Fall 1, dass möglicherweise nur ein kleiner EGFR-T790M-positiver Subklon der Tumorklone unter dieser Therapie zielsicher angegangen werden kann. In Fall 2 wäre aufgrund des gleichgewichteten Anteils mutierter EGFR Exon 19-Deletion und EGFR-T790M Allele molekularpathologisch durch eine Therapieadaption für die gesamte Tumormasse eine Wirksamkeit denkbar.

Abb. 2: Fallbeispiele für NSCLC-Patienten mit therapierelevanten EGFR-Primärmutationen. A) Fall 1 mit Punktmutation EGFR Exon 21 L858R, B) Fall 2 mit EGFR Exon 19 Deletion. Bei beiden Patienten wurden im Therapieverlauf jeweils 2 Liquid Biopsy Untersuchungen durchgeführt.



## Zusammenfassung

Als minimal-invasives Verfahren stellt die Liquid Biopsy eine Ergänzung zur FFPE-Gewebeprobe dar und ist im Gegensatz zur Gewebebiopsie für den Patienten mit nahezu keiner Belastung verbunden. Patienten mit EGFR-mutiertem NSCLC unter EGFR-TKI-Therapie können von einer frühzeitigen Erkennung möglicher Resistenzmutationen und einer Anpassung der EGFR-TKI-Therapie profitieren. Hierfür bietet sich ein Verlaufsmonitoring mittels Liquid Biopsy in regelmäßigen Zeitabständen von z.B. 3 Monaten an. Bei Patienten mit ausgedehnt metastasierten Tumoren lassen sich durch eine Liquid Biopsy Mutationen erfassen, die nur in einer oder einem Teil der Einzelmetastasen vorhanden sind und gegebenenfalls (noch) nicht im Gewebe des Primärtumors vorhanden waren.

Für die molekularpathologische Diagnostik von Mutationen in cfDNA gewinnt das NGS als hochsensitives Multiplex-Verfahren zunehmend an Bedeutung, insbesondere durch die Möglichkeiten, bisher unbekannte Resistenzmechanismen zu identifizieren. So können sich aus einem Tumormutationsprofil einer NGS-Analyse mittels Liquid Biopsy möglicherweise auch neue Therapieansätze für eine zielgerichtete Krebstherapie eröffnen. Für die Mutationsdiagnostik auf

Basis von FFPE-Gewebeproben werden NGS-basierte Verfahren bereits zertifiziert und qualitätsgesichert in der Krankenversorgung eingesetzt. Durch die umfassende Validierung und Qualitätssicherung im Rahmen der molekularpathologischen Diagnostik können Anwendungen für die Liquid Biopsy und Testverfahren auf cfDNA-Basis aus der Forschung in die klinische Routine übertragen werden.

**Interessenkonflikte:** Martin Werner erhielt Reisekostenübernahmen von Roche. Silke Laßmann erhielt finanzielle Zuwendungen von AstraZeneca und Novartis.



**Dr. rer. nat. Tamara Werner**

Universitätsklinikum Freiburg  
Institut für Klinische Pathologie  
Breisacher Str. 115A  
79106 Freiburg im Breisgau

Tel.: 0761/27080240  
E-Mail: t.werner@dkfz.de



**Apl.-Prof. Dr. Silke Laßmann (BSc., PhD.)**

Universitätsklinikum Freiburg  
Institut für Klinische Pathologie  
Breisacher Str. 115A  
79106 Freiburg im Breisgau

Tel.: 0761/27080620  
E-Mail: silke.lassmann@uniklinik-freiburg.de



**Prof. Dr. med. Martin Werner**

Universitätsklinikum Freiburg  
Institut für Klinische Pathologie  
Breisacher Str. 115A  
79106 Freiburg im Breisgau

Tel.: 0761/27080060

E-Mail: [pathologie.direktion@uniklinik-freiburg.de](mailto:pathologie.direktion@uniklinik-freiburg.de)

**ABSTRACT**

T. V. Werner, S. Laßmann, M. Werner, Institut für Klinische Pathologie, Universitätsklinikum Freiburg & Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Partnerstandort Freiburg, und Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg.

As a complementary technique to the analysis of tissue biopsies, minimally invasive liquid biopsies add additional information for precision oncology, such as comprehensive mutation profiling of heterogeneous tumors and metastases or early monitoring of therapy resistance, tumor recurrence and residual disease. Currently, liquid biopsy based analysis of cfDNA from blood shows the most promising potential for medical care. Technological progress has improved the sensitivity of detection of mutations with very low allele frequencies as well as multiplex screening and detection for case specific unknown mutations in cfDNA. However, there is still a necessity for tight validation of preanalytical issues in sample collection and processing, which ultimately affect interpretation of liquid biopsy results and their medical implementation.

**Keywords:** *Liquid biopsy, mutation profiling, cfDNA*