



Implementierung von Liquid Biopsy

Minimalinvasives Diagnose-Toolkit für kindliche Krebserkrankungen

■ Die Liquid Biopsy bietet eine minimalinvasive Alternative zu konventionellen Tumorbiopsien und ist vielversprechend für die Präzisionsmedizin. Ein neuer Ansatz soll die Implementierung der Liquid Biopsy in der pädiatrischen Onkologie beschleunigen. Bisher war ihr Einsatz dadurch begrenzt, dass Tumore im Kindesalter nur wenige genetische Veränderungen aufweisen, die in der zellfreien, im Blutstrom zirkulierenden DNA nachgewiesen werden können. Dr. Eleni Tomazou, Leiterin der Forschungsgruppe Epigenombasierte Präzisionsmedizin an der St. Anna Kinderkrebsforschung in Wien, erläutert die Hintergründe der neuen Analysemethode.

M&K: *Welchen neuen Ansatz verfolgt die Methode?*

Dr. Eleni Tomazou: Für viele Krebsarten im Erwachsenenalter wurde die Liquid-Biopsy-Analyse der zellfreien DNA aus dem peripheren Blut zu ei-

ner klinisch validierten Methode entwickelt, von der man sich einen wichtigen Beitrag für die Frühdiagnose, Stratifizierung von Patientinnen und Patienten sowie für die Therapieüberwachung verspricht. Die Entnahme peripherer Blutproben geht schnell, ist minimalinvasiv und ermöglicht somit eine Längsschnittanalyse mit hoher zeitlicher Auflösung. Bei Krebspatienten umfasst die zellfreie DNA in der Regel die vom Krebs stammende zirkulierende DNA, die durch absterbende Tumorzellen in den Blutkreislauf gelangt. Tumorspezifische genetische Veränderungen können in der zellfreien DNA nachgewiesen werden, um die Tumorlast und das genetische Profil des Tumors zu beurteilen.

Bei pädiatrischen Tumoren besteht eine große Herausforderung darin, dass es kaum wiederkehrende genetische Aberrationen gibt. Das Ewing-Sarkom zum Beispiel, ein Krebs im Kindesalter mit hohem ungedecktem Behandlungsbedarf und wenigen wie-

derkehrenden genetischen Aberrationen, ist durch EWS-ETS-Fusionsgene (einschließlich EWS-FLI1 als häufigster onkogener Treiber) einzigartig charakterisiert. Allerdings haben Assays zum Nachweis des Fusionsgens in zellfreier DNA tendenziell eine geringe Sensitivität, insbesondere, wenn der genaue chromosomale Bruchpunkt nicht bekannt ist. Um diese Herausforderung zu überwinden, wurden alternative Ansätze zur Flüssigbiopsie-Analyse von Ewing-Sarkomen verfolgt, die sich auf die weitverbreiteten epigenetischen Veränderungen dieser Tumore stützen anstatt auf ihre wenigen genetischen Veränderungen.

Damit eröffnen sich neue Perspektiven für die Präzisionsmedizin bei Krebsarten mit geringer Mutationslast. Wir haben einen integrierten Ansatz für die Flüssigbiopsie-Analyse entwickelt, der die nicht-genetischen Eigenschaften der zellfreien DNA ausnutzt. Diese neue Methode kombiniert die Genomsequenzierung der

zellfreien DNA mit bioinformatischen Methoden, um tumorspezifische Fragmentierungsmuster der zellfreien DNA auszuwerten.

Inwieweit geben die Fragmentierungsmuster der zirkulierenden DNA Aufschluss über die genetische Regulation?

Tomazou: Die zellfreie DNA besteht aus doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit einer durchschnittlichen Größe von unter 200 Basenpaaren. Die Fragmentierung der DNA aus absterbenden Tumorzellen ist weder zufällig noch allein durch die DNA-Sequenz bestimmt; sie spiegelt vielmehr die Chromatinstruktur und den epigenetischen Zustand der Zellen wider, aus denen die DNA-Fragmente gewonnen wurden. Da Ewing-Sarkome sehr charakteristische epigenetische Veränderungen aufweisen, ist es durch die Analyse der zellfreien DNA-Fragmentierungsmuster nicht nur möglich, die

vom Tumor stammende zellfreie DNA in Abwesenheit von wiederkehrenden genetischen Aberrationen zu quantifizieren, sondern auch minimalinvasive Einblicke in den epigenetischen Zustand des Tumors im Verlauf der Erkrankung zu erhalten.

Was bedeutet dies für die Diagnose und Tumoridentifikation?

Tomazou: Wir gehen davon aus, dass die klinische Validierung dieses Ansatzes bei einer größeren, unabhängigen Patientengruppe zur Einbeziehung von auf zellfreier DNA-Fragmentierung basierenden Flüssigbiopsie-Assays in prospektive klinische Studien führen wird. In solchen adaptiven Studien sollen die Auswirkungen der Krankheitsüberwachung mit unserem Flüssigbiopsie-Assay auf das Gesamtüberleben sowie die kurz- und langfristige Morbidität bei Patienten mit Ewing-Sarkom beurteilt werden.

Während das genaue Design der nächsten klinischen Studien gemäß etablierter Workflows und Guidelines entwickelt wird, könnte eine mögliche Einbeziehung von Liquid-Biopsy-Assays wie folgt strukturiert sein. Bei Verdacht auf ein Ewing-Sarkom (oder andere pädiatrische Tumore) könnten Patienten eine Ganzgenom-Sequenzierung der zellfreien DNA erhalten, um ...

- die molekulare Diagnose eines Ewing-Sarkoms zu stellen (möglicherweise schneller als mit herkömmlichen Methode),
- die Tumorlast zu quantifizieren,
- auf Anzeichen einer anderweitig noch nicht erkennbaren Metastasierung zu testen (bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung)
- und Patienten einem hohen oder niedrigen Rückfallrisiko zuzuordnen.

Während der neoadjuvanten Induktionstherapie könnten die Patienten in kurzen Abständen eine kosteneffiziente, flächendeckende Gesamtgenomsequenzierung der zellfreien DNA erhalten, um die Dynamik des Behandlungsansprechens zu überwachen. In einem Arm einer klinischen Studie könnte zu definierten Zeitpunkten eine Deeskalation der Therapie für Patienten mit gutem Ansprechen und/oder eine Neuanpassung der Behandlung für Patienten mit schlechtem Ansprechen erwogen werden. Nach der Operation könnte die Krankheitsüberwachung mit regelmäßigen flächendeckenden Gesamtgenomsequenzierungen der zellfreien DNA fortgesetzt werden, wobei sich der Schwerpunkt schließlich von der Überwachung des Behandlungseffekts auf die Früherkennung eines möglichen Rückfalls



Dr. Eleni Tomazou

Foto: Harald Eisenberger

Zur Person

Dr. Eleni Tomazou leitet die Forschungsgruppe Epigenom-basierte Präzisionsmedizin an der St. Anna Kinderkrebsforschung in Wien. Zuletzt erhielt Tomazou einen mit € 900.000 dotierten Life Science Grant für Präzisionsmedizin des Wiener Wissenschafts-, Forschungs- und Technologiefonds. Tomazou studierte Molekular- und Zellbiologie an der University of Glasgow und forschte während ihres Studiums für ein Jahr am European Molecular Biology Laboratory und der Universität Heidelberg. Es folgte eine Dissertation in Biologie an der University of Cambridge und dem Wellcome Trust Sanger Institute, eine Postdoc-Position am Harvard Department of Stem Cell and Regenerative Biology sowie eine wissenschaftlich-diagnostische Tätigkeit im Bereich der HLA-Typisierung beim Amerikanischen Roten Kreuz.

verlagern wird. Die Behandlung von Patienten, die einen Rückfall erleiden, könnte sofort nach dem Nachweis der Flüssigbiopsie beginnen, ohne auf einen klinisch bzw. radiologisch manifesten Rückfall zu warten.

Wie bereits erwähnt, ist die Flüssigbiopsie ein vielversprechender Ansatz für die Präzisionsmedizin. In den nächsten Jahren liegt allerdings noch viel Arbeit vor uns, um den klinischen Nutzen solcher Assays zu validieren und zu bestätigen, bevor sie in der klinischen Praxis eingesetzt werden können.

Welche Messsysteme wurden zur Analyse der DNA-Fragmentierung eingesetzt und welche Ergebnisse konnten damit gewonnen werden?

Tomazou: Wir haben eine integrierte genetische bzw. epigenetische Analyse entwickelt und auf 241 Gesamtgenom-Sequenzierungsprofile (~12x Abdeckung) von 95 Patienten mit Ewing-Sarkomen und 31 Patienten mit anderen pädiatrischen Sarkomen angewandt. Dabei gelang eine sensitive Erkennung und Klassifizierung der vom Tumor stammenden zellfreien DNA im peripheren Blut unabhängig von genetischen Veränderungen. Wir haben verschiedene Metriken für die zellfreie DNA-Analyse evaluiert und Liquorice entwickelt – ein bioinformatisches Tool zur Detektion von aus Tumor stammender zellfreier DNA auf Basis der tumorspezifischen Chromatinstruktur. Unter Verwendung von Methoden des maschinellen Lernens kombinierten wir mehrere zellfreie DNA-Fragmentierungsmetriken zu einem integrierten Ansatz für die Flüssigbiopsie-Analyse, der auf Krebserkrankungen mit niedrigen Mutationsraten, aber weitverbreiteter epigenetischer Deregelation zugeschnitten ist. Der nachgewiesene Zusammenhang mit klinischen Parametern wie dem Rezidiv-freien Überleben unterstreicht den potentiellen Wert von zellfreien DNA-Fragmentierungsmustern als prognostischer Biomarker beim Ewing-Sarkom.

Automatische Analysesysteme, Algorithmen und Machine Learning gewinnen in vielen medizinischen

Bereichen an Bedeutung. Welchen Stellenwert haben diese Aspekte bei der neuen Analyseverfahren?

Tomazou: Der beschriebene Flüssigbiopsie-Assay wäre ohne die Hilfe von neuartigen bioinformatischen Werkzeugen und auf maschinellem Lernen basierenden Klassifikatoren nicht entwickelt worden. Wie beschrieben, bergen Ansätze des maschinellen Lernens, angewandt auf große genomische bzw. epigenetische Datensätze, großes Potential für die personalisierte Medizin, aber ihre Anwendung muss zunächst systematisch validiert werden. Es ist zu erwarten, dass laufende Studien die Einschränkungen bei der Implementierung von maschinellen Lernansätzen in der klinischen Praxis aufzeigen werden. Solche Einschränkungen sollten bei der Verwendung von Machine-Learning-basierten Modellen nicht ignoriert werden. In diesem Zusammenhang wichtige Punkte sind etwa die Definition der idealen Größe der Patientengruppe, die Merkmalsauswahl, das Reporting über die Modellleistung und die Notwendigkeit einer unabhängigen Validierungs-Patientenkohorte.

Wo sehen Sie Einsatzbereiche der neuen Analyseverfahren?

Tomazou: Der vorgestellte Ansatz zur Analyse von Gesamtgenomsequenzierungsdaten basiert nicht auf genetischen Aberrationen, sondern auf den charakteristischen Fragmentierungsmustern der zellfreien DNA und auf gewebespezifischen epigenetischen Signaturen. Er wurde bereits zur Tumordetektion und -klassifizierung sowie zur Überwachung von therapieinduzierter Toxizität – durch Detektion der leberspezifischen epigenetischen Signatur – eingesetzt. Der Ansatz könnte auch zur Erkennung okkult Metastasen, zur Klassifizierung von Krebserkrankungen unbekannter Herkunft und zur Bewertung des Ansprechens auf eine Therapie, einschließlich Immuntherapie, eingesetzt werden. Ein ähnlicher Ansatz könnte auch bei der Beurteilung von Abstoßungsreaktionen nach Transplantation und Gewebeschädigung z. B. aufgrund einer COVID-19-Infektion eingesetzt werden. ■■

Autor:

Dr. Jutta Jessen, Weinheim