

**LAUF FÜR DIE  
KREBSFORSCHUNG!**

**SAMSTAG, 8. OKTOBER 2022  
10-14 UHR**

#krebsforschungslauf #wirlaufenweiter  
Krebsforschungslauf @meduniwien  
www.krebsforschungslauf.at



## “Liquid Biopsy” – neue Biomarker Quelle bei Hirntumoren bei Kindern

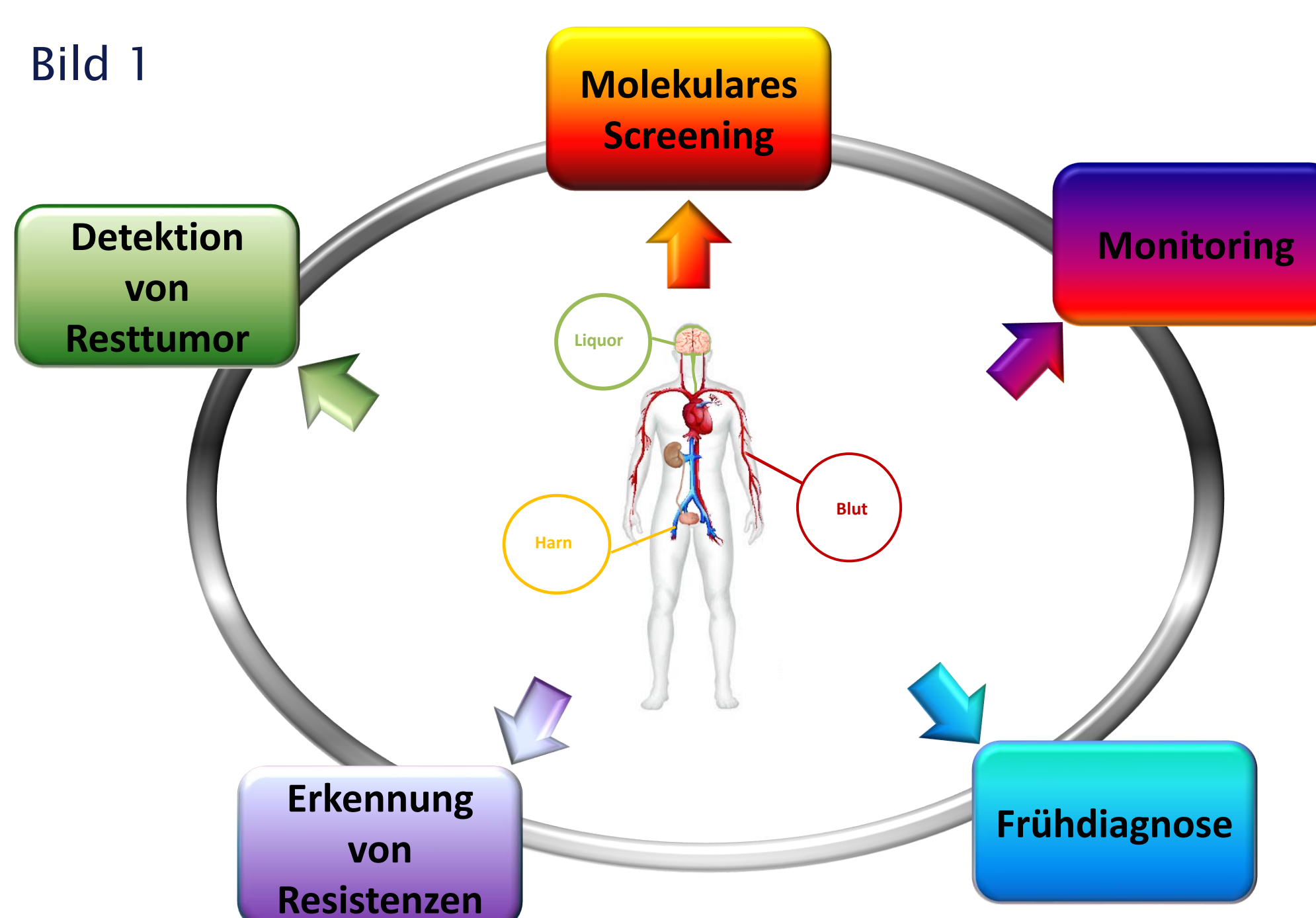
Sibylle Madlener

Univ. Klinik für Kinder und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien

### Idee

Körperflüssigkeiten und deren molekulare Inhalte sind in den vergangenen Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Einer der größten Vorteile gegenüber der herkömmlichen Gewebebiopsie ist die Möglichkeit Verlaufskontrollen kombiniert mit einer kaum invasiven Abnahmemethode (zB. Blutabnahme) durchzuführen. Dadurch ist eine Überwachung der Tumorerkrankung und des Therapieansprechen möglich. Weitere klinische Perspektiven von „Liquid Biopsien“ sind in Bild 1 graphisch dargestellt<sup>1</sup>.

Bild 1



### Methoden

Isolierte DNA oder RNA wird aus Flüssigkeitsproben (Hirnflüssigkeit, Blut) mit zwei verschiedenen PCR Techniken untersucht. In Bild 2 sind die beiden Methoden gegenübergestellt. Die qPCR ist eine quantitative PCR Methode bei der in Echtzeit die Vermehrung des Zielgens dargestellt wird (2A) und man erhält einen CT Wert der über die Anreicherung eine Aussage gibt. Bei der digitalen droplet PCR (ddPCR) Technik (handelt es sich um eine sehr sensitive Analysemethode, die aus dem ursprünglich hergestellten Pool bestehend aus Primer, DNA und Buffer 20.000 Tröpfchen generiert. In jedem einzelnen dieser Tröpfchen wird eine eigenständige PCR durchgeführt. Am Ende wird jedes Tröpfchen analysiert (2B). Dadurch ist diese PCR Variante die perfekte Methode für sehr sensitive und selektive Biomarker<sup>2</sup> – zum Beispiel Mutationen.

### Literatur

1. “Liquid Biomarkers for pediatric brain tumors: biological features, advantages and perspectives” J.Pers. Med. 2020, 10, 254. <https://doi.org/10.3390/jpm10040254>
2. Using droplet digital PCR to analyze MYCN and ALK copy number in plasma from patients with neuroblastoma. *Oncotarget*; Vol 8, No 49 (2017).
3. “Personalized Treatment of H3K27M-Mutant Pediatric Diffuse Gliomas Provides Improved Therapeutic Opportunities” published in *Frontiers Oncology* 2020, DOI. 10.3389/fonc.2019.01436

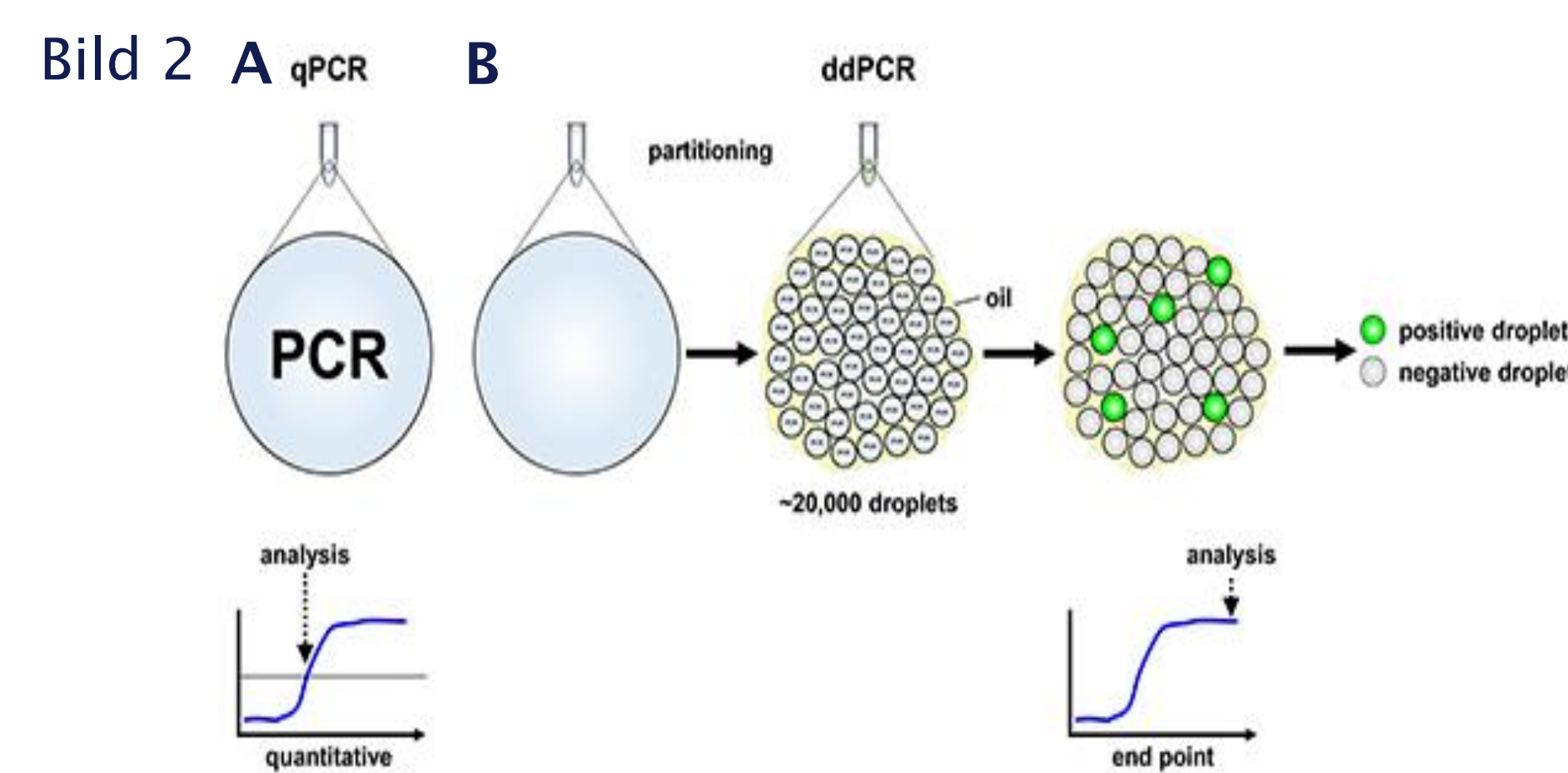


Bild 2: Vergleich PCR Methoden:

2A) qPCR Methode mit Echtzeitmessung. Der „Cycle Threshold“ (CT-Wert) gibt die Zyklusanzahl an, die benötigt wird um ein Gen zu vermehren. Je niedriger dieser Wert ist umso mehr Zielgen ist vorhanden. 2B) Die ddPCR Methode ist eine Endzeitmessung. Es werden 20.000 Tröpfchen aus einem Pool generiert und einzeln ausgewertet. Am Ende der PCR wird die Analyse durchgeführt. Alle Tröpfchen die ein Zielgen vermehrt haben leuchten auf und werden gezählt.

### Ergebnisse

In der ersten Studie wurden spezifische miRNA Konzentrationen im Blut von Hirntumor Patienten untersucht. Analysiert wurden Kinder, die an einem Medulloblastom erkrankt sind, aber unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigten (MB\_1: Patient in Tumorermission = bedeutet radiologisch kein Tumor erkennbar, MB\_2: Patient mit aggressiven Tumorverlauf). Die entsprechenden miRNAs wurden in den Blutseren mittels Anreicherung der einzelnen Sequenzen analysiert und mit Kontrollseren von Patienten ohne Tumorerkrankung verglichen. MB\_2 zeigt bei allen spezifischen miRNAs (6 miRNAs zusammengefasst) einen hoch signifikanten Spiegel im Vergleich zu MB\_1 und zum Kontrollserum, das den aggressiven Tumorverlauf bestätigt (siehe Bild 3)

Bild 3

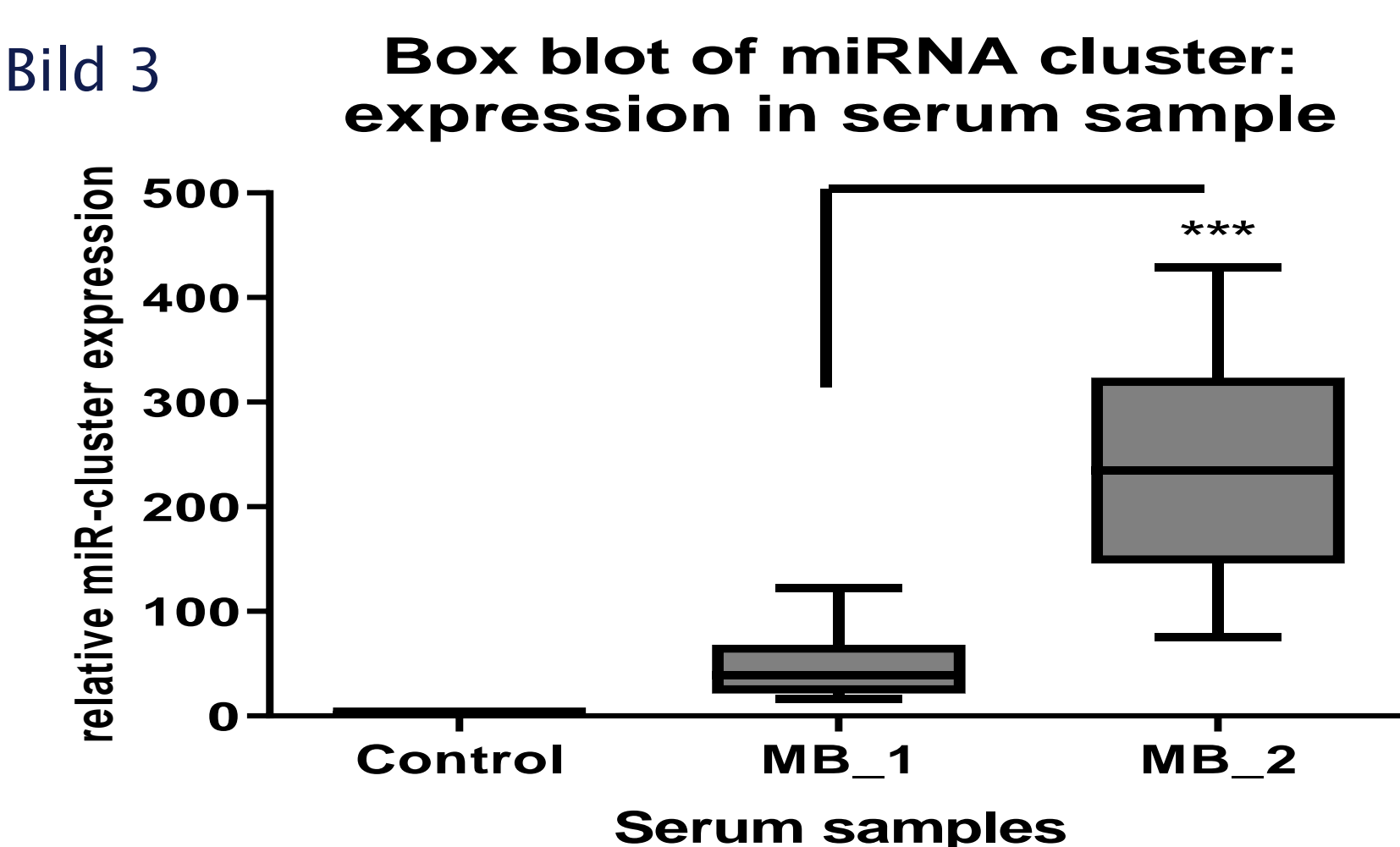


Bild 3: qPCR Analyse:

Detektion einer miRNA Familie (n=6) im Blutserum von 2 Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Kontrolle: Pool aus 20 Patienten die keine Tumordiagnose haben. Statistik: students t-test: p\*\*\*<0,001

In der zweiten Studie konnten wir bereits vor der radiologischen Bildgebung eine Zunahme der tumorspezifischen Mutation in der Hirnflüssigkeit feststellen (siehe Bild 4). Dieser Tumortyp (Diffuses Midline Gliom) hat aufgrund der Lokalisation eine sehr schlechte Prognose.

Durch die personalisierte Therapie konnte in Kombination mit der Strahlentherapie vorübergehend ein Ansprechen (siehe 4A/B) gezeigt werden. Nach Absetzen der Therapie haben wir eine “Liquid Biopsy” durchgeführt, um die spezifische Mutation zu untersuchen. Im Abstand von drei Monaten wurde erneut die Hirnflüssigkeit untersucht und es wurde ein deutlicher Anstieg der Mutationskopien in der Probe festgestellt (siehe Bild 4C - jeweils im oberen linken Quadranten). Die Mutationsrate hat sich in dieser Zeit verdreifacht<sup>3</sup>. Kurze Zeit später wurde diese Verschlechterung auch in der Bildgebung bestätigt.

Bild 4

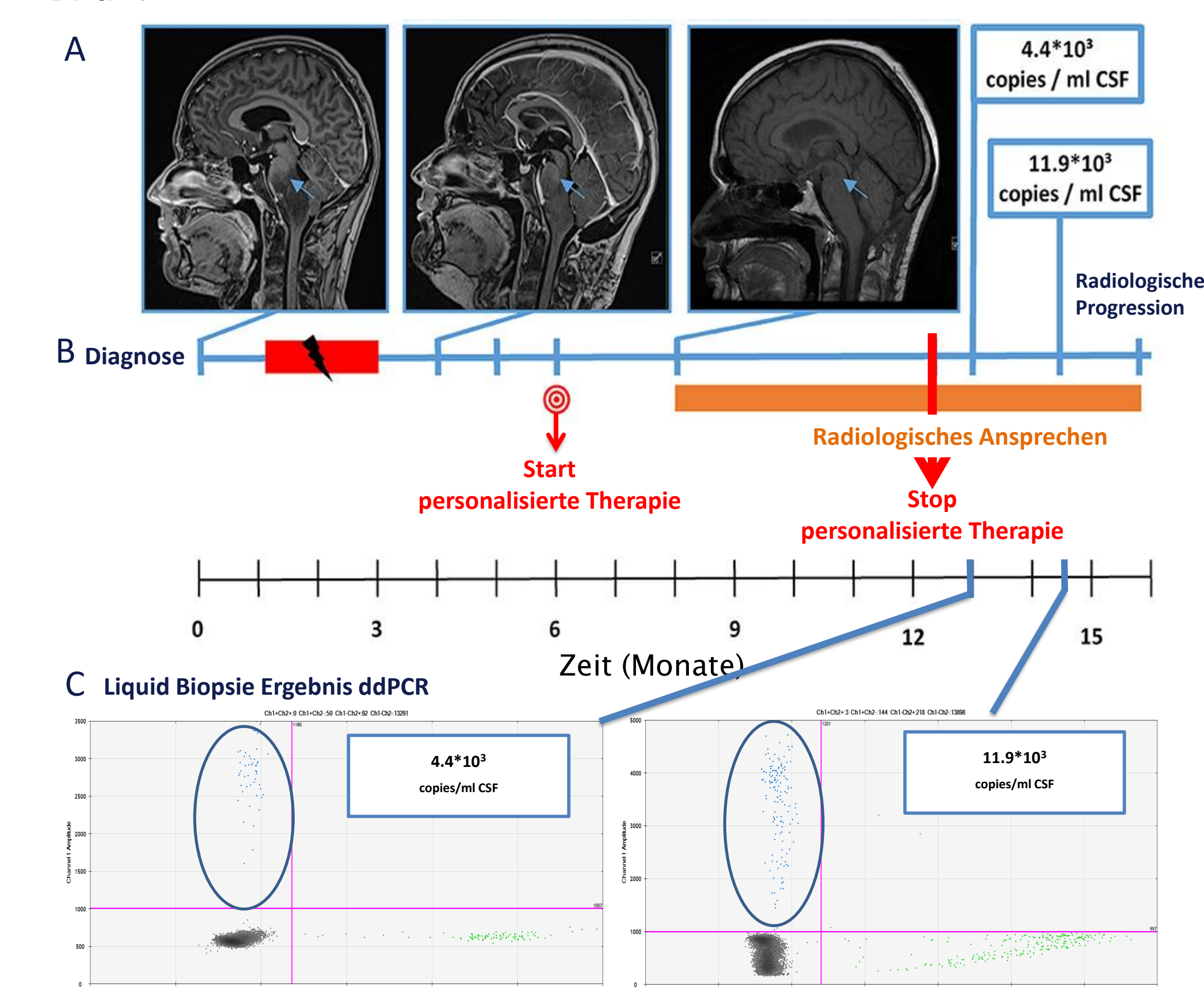


Bild 4: Longitudinale Studie bei einem sehr aggressiven Hirntumor.

4A) Zeigt die MRT Bilder im Abstand von 4 Monaten. Der Tumor ist mit einem blauen Pfeil markiert. In 4B ist die Zeitachse mit allen Interventionen und Therapien abgebildet. 4C und 4D zeigen jeweils das Ergebnis der Mutationsmessung mittels ddPCR Methode (siehe blaue ovale Feld).

### Zusammenfassung

Wir konnten in unserer Arbeit einige vielversprechende Marker identifizieren und auch die ersten Studien erfolgreich durchführen. Aber zum aktuellen Zeitpunkt sind die potentiellen Marker nur experimentell anwendbar und es benötigt noch weitere Studien mit einer größeren Probandenzahl bis diese routinemäßig in der Klinik umgesetzt werden können. Trotzdem ist die “liquid biopsy” sicher die Zukunft in der Überwachung von personalisierter Therapie.

### DANKE

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Irene Slavic für die Unterstützung und bei meinen Kollegen vor allem bei Johannes Gojo, Andreas Peyrl, Daniel Senfter, uvm, sowie bei allen Kooperationspartnern.