

Master-Thesis

Thema: **Präanalytische Evaluierung von Blutentnahmeröhrchen für die Analyse von zirkulierender Tumor-DNA**

Zusammenfassung:

Das Interesse an zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA) aus Blutplasma als Biomarker für Mutationsdiagnostik und Progressionsüberwachung in der Onkologie wächst stetig. Derzeit gibt es keinen Standard in Bezug auf präanalytische Prozesse von zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) wie Blutentnahme, Versand oder Plasma-Präparation. Dies bremst den Fortschritt von Technologien zur Analyse von ctDNA, wie die hoch-sensitive digitale PCR-Methode BEAMing, aus. Eine Hürde zur personalisierten Diagnostik besteht darin, das unprozessierte Blut in ein Zentrallabor zu transportieren, ohne dass es zur Blutzellenlyse und damit zur Freisetzung von genomischer DNA (gDNA) kommt. Durch gDNA wird die gering konzentrierte ctDNA verdünnt, was die Analyse erschwert.

Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung von drei Blutentnahmesystemen (BD Vacutainer® K2E, BD Vacutainer® PPT™ und Streck Cell-Free DNA BCT™) zur Verwendung in der Analyse von ccfDNA durch die BEAMing-Technologie. Des Weiteren sollte ein Plasma-Präparationsprotokoll zum empfohlenen Blutröhrchen erarbeitet und die Anforderungen an die Präanalytik definiert werden.

Die in K₂EDTA-, PPT- und Cell-free DNA BCT-Blutröhrchen entnommen Blutproben wurden unter verschiedenen Konditionen (Temperaturen und Zeitspannen) gelagert. Das Plasma wurde präpariert und die ccfDNA extrahiert. Um die ccfDNA-Ausbeute, die Freisetzung genomischer Wildtyp-DNA im Plasma sowie eine PCR-Unzugänglichkeit durch Zellstabilisatoren zu ermitteln, wurden quantitative Realtime PCRs (qPCRs) durchgeführt. Zur Bestimmung potentieller mutagener Eigenschaften der in den Röhrchen enthaltenen Reagenzien wurde die digitale BEAMing-PCR angewendet.

Nach der Analyse des präanalytischen Prozesses konnte der Blutproben-Transport bei Raumtemperatur als am geeignetsten für die BEAMing-Technologie ermittelt werden. Da PPT-Röhrchen den Transport des gefrorenen Plasmas voraussetzten, können sie diese Anforderungen nicht erfüllen. Dahingegen erfüllt das Streck Cell-Free DNA BCT™-Blutentnahmesystem den Anspruch. Es zeigte bei Raumtemperatur bis zu fünf Tagen stabile ccfDNA- sowie gDNA-Konzentrationen. Bei Temperaturen von 4 °C und 40 °C kam es in Streck Cell-Free DNA BCT™-Proben dagegen zu einem Anstieg von gDNA. Da die PCR-Zugänglichkeit bei allen Lagerkonditionen gezeigt werden konnte und der Mutations-Hintergrund bei keiner Kondition anstieg, kann ein Einfluss des Stabilisators durch DNA-Quervernetzungen oder Mutagenität ausgeschlossen werden.

Streck Cell-Free DNA BCT™-Blutröhrchen können für die Stabilisierung von Vollblut bei Raumtemperatur für mindestens fünf Tage empfohlen werden. Somit kann die Transporthürde für die personalisierte Diagnostik überwunden werden. Ein standardisiertes Protokoll zur Präparation von ccfDNA aus Plasma unter Verwendung von Streck Cell-Free DNA BCT™-Systemen konnte erfolgreich etabliert werden. Ziel weiterer Studien ist es, diese Ergebnisse mit einer größeren Donorenanzahl sowie Temperaturspanne zu verifizieren.

Verfasserin: Inga Medina Diaz

Datum der Abgabe: 02.10.2014