

Biomarker

Untersuchung von miRNAs mithilfe getrockneter Blutstropfen

CAROLINE DIENER¹, ANDREAS KELLER², ECKART MEESE¹

¹ INSTITUT FÜR HUMANGENETIK, UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG

² KLINISCHE BIOINFORMATIK, UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, SAARBRÜCKEN;
DEPARTMENT OF NEUROLOGY & NEUROLOGICAL SCIENCES, STANFORD UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE, STANFORD, USA

Due to their connection to a great diversity of diseases and their prevalence in blood, microRNAs (miRNAs) are envisaged as biomarkers in liquid biopsy diagnostics. Utilizing dried blood spots (DBS) for the isolation of miRNAs greatly facilitates both the sample collection and the storage in comparison to liquid blood. MiRNAs isolated from DBS can be used for the analysis of individual miRNAs and for high-throughput analyses of the entire miRNome.

DOI: 10.1007/s12268-020-1356-8
© Die Autoren 2020

Der Nachweis von Erkrankungen, die Auswahl der richtigen Therapie und die Einschätzung von Heilungschancen sind zentrale Aufgaben der modernen klinischen Diagnostik. Die Suche nach krankheitsspezifischen und messbaren biologischen Parametern, den Biomarkern, ist daher wichtiger Bestandteil der aktuellen biomedizinischen Forschung. Voraussetzung für die Auswahl von Biomarkern sind dabei ihre Quantifizierbarkeit und eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse [1]. Biomarker, die auf der Basis von Körperflüssigkeiten (*liquid biopsies*) untersucht werden können, sind von besonderem Interesse, da sie im Rahmen eines minimalinvasiven Eingriffs für diagnostische Zwecke zugänglich sind [2]. In diesem Zusammenhang sind MikroRNAs (miRNAs) zunehmend in den Fokus der Biomarkerforschung gerückt [3]. MikroRNAs gehören zu einer Gruppe von kleinen, nicht-codierenden Nukleinsäuren und spielen in eukaryotischen Zellen eine zentrale Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression [4]. Da miRNAs viele Zielgene regulieren und die Regulation eines Zielgens wiederum durch mehrere miRNAs erfolgen kann, hat der miRNA-Expressionszustand einen entscheidenden Einfluss auf zentrale zelluläre Signalwege [5, 6] und

damit auch auf die Entstehung von Erkrankungen wie Krebs oder Alzheimer [7, 8]. Zur Analyse der miRNA-Expression stehen eine Reihe etablierter molekularbiologischer Verfahren zur Verfügung [6]. Vor diesem Hintergrund bieten sich miRNAs als innovative Biomarker für die klinische Diagnostik an [9, 10]. Da sie sowohl in zellulären Komponenten als auch extrazellulär im Blut vorliegen, besteht zudem die Möglichkeit, miRNAs im Rahmen einer *liquid biopsy*-Diagnostik zu untersuchen [6, 9].

Verwendung von getrockneten Blutstropfen zur Untersuchung von miRNAs

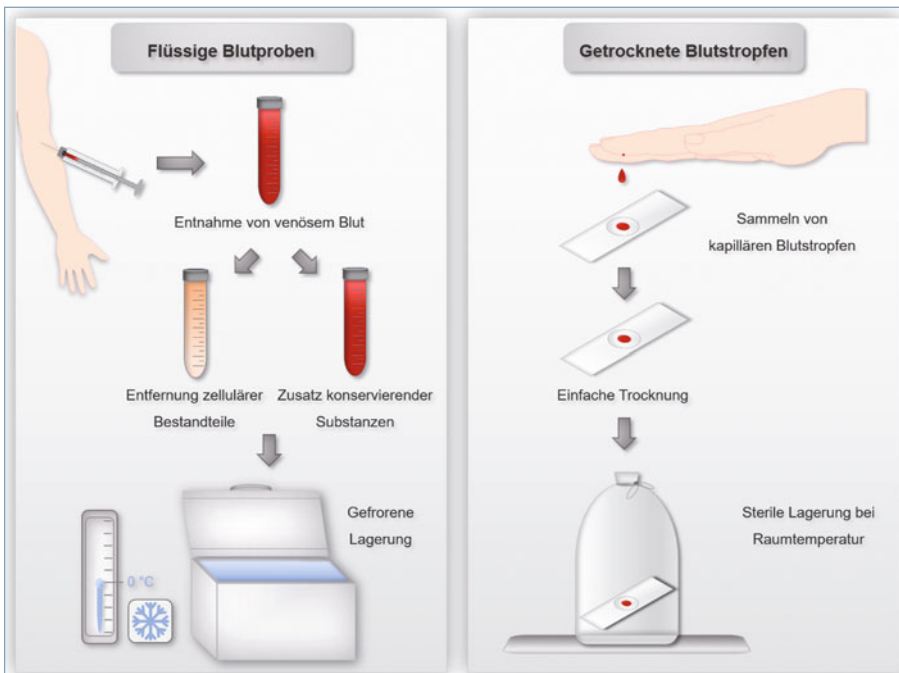
Die Verwendung von flüssigen Blutproben als Ausgangsmaterial für miRNA-Analysen erfordert begleitende Maßnahmen zur Konservierung des Probenmaterials. Um die miRNAs im Zeitraum zwischen Blutentnahme und RNA-Isolation vor möglichen Abbauvorgängen zu schützen, müssen RNA-stabilisierende Reagenzien zugegeben oder zelluläre Bestandteile des Blutes entfernt werden [6]. Zudem ist eine Lagerung der Vollblut- bzw. Serum/Plasma-Proben bei Temperaturen zwischen -20 und -80 °C notwendig, um die RNA-Qualität zu erhalten [11, 12]. Eine Alternative zur Verwendung von flüssigen

Blutproben besteht in der Analyse von getrockneten Blutstropfen. Zur Herstellung dieser *dried blood spots* (DBS) werden nach einem Stich in die Haut einige Tropfen von kapillarem Blut auf absorbierendem Material gesammelt und die Probe anschließend mittels Trocknung konserviert. Im Rahmen von Neugeborenen-Screenings werden DBS zu diagnostischen Zwecken bereits seit den 1960er-Jahren verwendet. Beispielsweise kann zur Diagnose der Phenylketonurie der Gehalt von Phenylalanin im Blut auf Basis von DBS bestimmt werden [13]. Wie wir und andere in Pilotstudien zeigen konnten, liefern DBS-Analysen technisch reproduzierbare miRNA-Daten, die zudem eine hohe Übereinstimmung mit den Analysen entsprechender flüssiger Blutproben zeigen [14]. Eine vollständige Trocknung der Blutstropfen ist dabei Voraussetzung für die Qualität der DBS-basierten miRNA-Daten [14]. Aspekte wie die Lagerungstemperatur haben dagegen nur einen geringen Einfluss auf die späteren Messergebnisse [14].

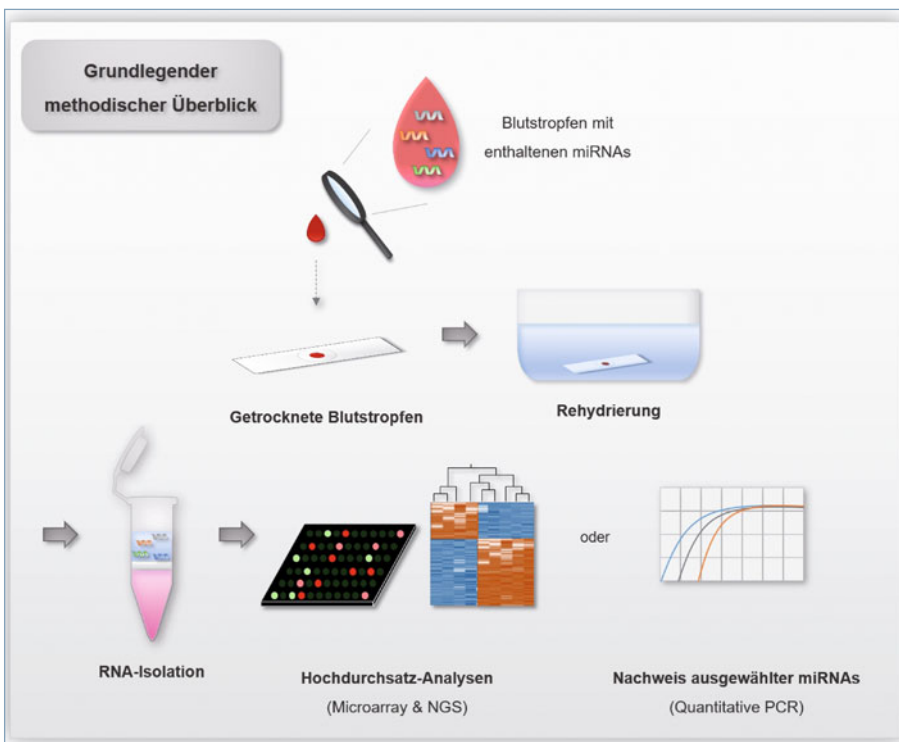
Durch die einfache methodische Vorgehensweise bei der Herstellung und Lagerung der DBS, das heißt die Gewinnung von Kapillarblut aus der Fingerbeere, die anschließende Konservierung der Blutprobe durch einfaches Trocknen sowie die Lagerungs- und Transportmöglichkeit der Proben bei Raumtemperatur (**Abb. 1**), könnten DBS-basierte miRNA-Analysen einfach in den diagnostischen Arbeitsalltag integriert werden. Im Vergleich zu flüssigen Blutproben können mit DBS zudem mögliche Fehlerquellen innerhalb der präanalytischen Untersuchungsphase reduziert werden. Dazu zählen beispielsweise die Arbeitsschritte zur Konservierung des Probenmaterials im Anschluss an die Blutentnahme. Des Weiteren können Kosten, unter anderem durch den Wegfall einer gekühlten Lagerung, eingespart werden [6, 14].

Möglichkeiten zur Analyse der miRNA-Expression auf Basis von DBS

Zur Untersuchung der miRNA-Expression auf der Basis von DBS, müssen die Proben



▲ **Abb. 1:** Vorgehensweise in der präanalytischen Probenbearbeitungsphase bei der Verwendung von flüssigen Blutproben und getrockneten Blutstropfen zur Untersuchung der miRNA-Expression.



▲ **Abb. 2:** Methodischer Überblick zur Analyse der miRNA-Expression auf Grundlage von getrockneten Blutstropfen. Im Blut enthaltene miRNAs können in Form von getrockneten Blutstropfen konserviert werden. Zur Analyse der miRNA-Expression werden die Proben zunächst in RNA-stabilisierenden Reagenzien rehydriert, bevor die RNA-Isolation mittels organischer Extraktion durchgeführt werden kann. Die miRNA-Expression kann durch Nachweisreaktion einzelner miRNAs als auch für die Gesamtheit der miRNAs (miRNom) mittels Hochdurchsatzverfahren bestimmt werden. NGS, *Next Generation Sequencing*.

zunächst rehydriert werden. Anschließend kann die gesamte enthaltene RNA isoliert werden [14]. Für verschiedenste absorbierende Materialien, unterschiedliche Trocknungs- und Rehydrierungsbedingungen sowie verschiedene RNA-Isolationsmethoden liegen bereits erste vergleichende Untersuchungen vor [14]. In Zukunft sind allerdings noch umfassendere Studien notwendig, um beispielsweise die wechselseitige Abhängigkeit der verschiedenen Parameter zu spezifizieren (z. B. welchen Einfluss ein absorbierendes Material auf die Rehydrierungsbedingungen hat). Ziel sollte dabei eine weitestgehend standardisierte Verfahrensweise zur Lagerung und Gewinnung von RNA aus DBS sein, um die Grundlage für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Untersuchung von miRNA-Biomarkern zu schaffen [14]. Die isolierte RNA kann anhand verschiedener molekularbiologischer Verfahren analysiert werden (**Abb. 2**). Dabei können sowohl einzelne miRNAs mithilfe von quantitativen PCR-Methoden als auch die Gesamtheit aller exprimierten miRNAs (miRNom) durch Hochdurchsatzanalysen wie Microarray oder *Next Generation Sequencing* (NGS) untersucht werden [14].

Eine Herausforderung für Hochdurchsatzsequenzierungen von miRNAs auf Basis von DBS war in der Vergangenheit sicherlich die sehr geringe Menge an kapillarem Blut und damit die geringe Menge an enthaltener RNA. Im Zuge der Entwicklung neuerer Protokolle gibt es jedoch erste Ansatzpunkte, die zukünftig die Hochdurchsatzsequenzierung von miRNAs auf Basis von DBS ermöglichen könnten [15].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass getrocknete Blutstropfen in Zukunft dabei helfen könnten, miRNA-Biomarker innerhalb der klinischen Diagnostik zu etablieren. ■

Literatur

- [1] Strimbu K, Tavel JA (2010) What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5:463–466
- [2] Marrugo-Ramirez J, Mir M, Samitier J (2018) Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: a promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *Int J Mol Sci* 19, doi: 10.3390/ijms19102877
- [3] Baker M (2010) RNA interference: microRNAs as biomarkers. *Nature* 464:1227
- [4] Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
- [5] Diener C, Hart M, Alansary D et al. (2018) Modulation of intracellular calcium signaling by microRNA-34a-5p. *Cell Death Dis* 9:1008
- [6] Keller A, Meese E (2016) Can circulating miRNAs live up to the promise of being minimal invasive biomarkers in clinical settings? *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7:148–156
- [7] Mendell JT (2005) MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* 4:1179–1184

- [8] Pichler S, Gu W, Hartl D et al. (2017) The miRNome of Alzheimer's disease: consistent downregulation of the miR-132/212 cluster. *Neurobiol Aging* 50:167e1–167e10
- [9] Backes C, Meese E, Keller A (2016) Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects. *Mol Diagn Ther* 20:509–518
- [10] Keller A, Fehlmann T, Ludwig N et al. (2018) Genome-wide microRNA expression profiles in COPD: early predictors for cancer development. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 16:162–171
- [11] Ovstebo R, Lande K, Kierulf P et al. (2007) Quantification of relative changes in specific mRNAs from frozen whole blood – methodological considerations and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 45:171–176
- [12] Grasedieck S, Scholer N, Bommer M et al. (2012) Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia* 26:2414–2416
- [13] Guthrie R, Susi A (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:338–343
- [14] Diener C, Galata V, Keller A et al. (2019) MicroRNA profiling from dried blood samples. *Crit Rev Clin Lab Sci* 56:111–117
- [15] Pirritano M, Fehlmann T, Laufer T et al. (2018) Next generation sequencing analysis of total small noncoding RNAs from low input RNA from dried blood sampling. *Anal Chem* 90:11791–11796

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Eckart Meese
 Institut für Humangenetik
 Universität des Saarlandes
 Gebäude 60
 D-66421 Homburg
 eckart.meese@uks.eu

AUTOREN



Caroline Diener

2012–2017 Studium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes (B. Sc. und M. Sc.). Seit 2017 Doktorandin am Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes.



Andreas Keller

2005 Bachelor und Master in Bioinformatik. 2009 Promotion. 2008 *Vice President* bei Biomarker Discovery Center, Heidelberg. 2011 Director Diagnostic Innovation, Siemens AG, Healthcare Sector, Erlangen. 2013 Professor für Klinische Bioinformatik an der Universität des Saarlandes. 2019 Visiting Professor an der Stanford University, USA.



Eckart Meese

1986 Diplom in Biologie. 1987 Promotion. 1988 DFG-Stipendiat am Arizona Cancer Center, USA. 1990 Assistent Professor an der University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, USA. 1995 Professor für Humangenetik an der Universität des Saarlandes.