

Carlota Lucena-Porcel
Dr. med.

Qualitative comparison of fresh frozen and formalin fixed paraffin-embedded tissue samples – impact of fixation and storage duration on the quality of DNA and RNA extracts

Fach/Einrichtung: Pathologie
Doktormutter: Prof. Dr. med. Esther Herpel

Um zuverlässige und replizierbare wissenschaftliche Ergebnisse an humanen Biomaterialien zu erhalten werden gut charakterisierte Bioproben und deren korrespondierende Daten benötigt.

Betrachtet man humane Gewebe, die für Forschungszwecke verwendet werden, kommen am häufigsten FF und FFPE-Proben zum Einsatz. Auch Proben, die bereits jahrelang langzeitgelagert wurden, werden verwendet; bisher wurden jedoch keine systematischen Analysen bzgl. der Verwendbarkeit von FFPE vs. FF in Abhängigkeit der Lagerdauer und der Verwendung verschiedener Analysemethoden gemacht.

Folgende Fragestellungen wurden daher untersucht: 1) Einfluss der Organlokalisierung beziehungsweise der Art des Gewebes (Karzinom versus Sarkom versus Lymphom) auf die Qualität der Nukleinsäuren; 2) Einfluss der Dignität (benigne versus maligne) auf die Qualität der Nukleinsäuren; 3) Einfluss der Lagerdauer auf die Qualität der Nukleinsäuren.

Ergebnisse:

Es wurden sowohl formalinfixierte (FFPE) als auch kryoasservierte (FF), Tumor- und korrespondierende Normalgewebeproben verschiedener Organentitäten (epithelial (n = 192), mesenchymal (n = 148), hämatologisch (n = 94)) – asserviert im Zeitraum von 2006 bis 2014 - untersucht und deren Nukleinsäuren mittels zweier unterschiedlicher Isolationsmethoden (QIAcube von Qiagen und Hamilton TPS von Siemens) extrahiert. Durch eine standardisierte Quantifizierung und anschließende Qualitätskontrolle über die elektrophoretische Ermittlung der RIN sowie der DIN konnten aussagekräftige Erkenntnisse zur Verwendbarkeit der verschiedenen Probenarten gewonnen werden.

Bei der Extraktion von Nukleinsäuren konnte man beobachten, dass über eine Isolation mittels QIAcube (Qiagen) eine höhere Konzentration ($> 250 \text{ ng}/\mu\text{L}$) und Qualität der RNA (RIN > 4) als über die Isolation mittels TPS (Siemens) erreicht werden konnte.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Qualität der Nukleinsäuren zwischen Tumor und Normalgewebe - jeweils formalinfixiert (Tumor DIN = $3,2 \pm 0,8$, Normal DIN = $3,0 \pm 0,7$ / Tumor RIN = $2,6 \pm 0,7$, Normal RIN = $2,8 \pm 0,7$) und kryoasserviert (Tumor DIN = $7,9 \pm 1,1$, Normal DIN = $7,7 \pm 1,2$ / Tumor RIN = $5,5 \pm 2,1$, Normal RIN = $5 \pm 1,9$) beobachtet werden.

Hingegen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Qualität der Nukleinsäuren (insbesondere der RNA) zwischen den verschiedenen Organen; wobei in Lymphknotengewebe die höchste Integrität der Nukleinsäuren (RIN = 7,3 und DIN = 8,91) festgestellt werden konnte.

In Abhängigkeit der Fixierungsart zeigte sich, dass die Qualität der extrahierten DNA und RNA aus FFPE-Gewebeproben deutlich niedriger als die FF-Gewebeproben war.

In Bezug auf die Lagerungsdauer änderte sich die Qualität der DNA und RNA nicht, mit Ausnahme der Liposarkome (DIN 2007 = $2,9 \pm 0,24$ versus DIN 2014 = $3,9 \pm 0,61$). Ferner

wies, wie zu erwarten, die RNA-Qualität größere Schwankungen auf als die DNA, was letztlich über die Struktur der Nukleinsäuren erklärbar ist.

Folgende Schlussfolgerungen lassen sich daraus ziehen:

Die Wahl der Isolationsmethode hat offenbar Einfluss auf die Qualität und Quantität der Nukleinsäuren, insbesondere der RNA. Dies deutet darauf hin, dass die Auswahl der Isolationsmethode in Abhängigkeit der zu isolierenden Nukleinsäuren erfolgen sollte. Um diese Aussage zu untermauern, sollte in weiterführenden Untersuchungen die Effizienz weiterer Isolationsmethoden ausgetestet werden.

Desweiteren hat die Dignität eines Gewebes offenbar keinen bis geringen Einfluss auf die Qualität der Nukleinsäuren da für neoplastische und nichtneoplastische Gewebe gleich gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Hingegen hat die Entität eines Gewebes einen bedeutenden Einfluss auf die Qualität der Nukleinsäure, insbesondere der RNA. Dies bedeutet, dass zum Beispiel bei Tumorentitäten mit wenig Zellgehalt ggf. größere Gewebeproben für z.B. RNA-Extraktionsverfahren eingesetzt werden sollten.

Wie zu erwarten, bestätigen die vorliegenden Analysen, dass FFPE-Proben eine geringere RNA- und DNA-Qualität als FF-Proben aufgrund von *crosslinks* und Maskierung der DNA/RNA haben und *per se* FF besser für molekulare Analysen geeignet sind. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass aufgrund verbesserter Diagnose- und Therapieverfahren zukünftig weniger FF zur Verfügung stehen wird und vermehrt auf andersartig fixiertes humanes Gewebe für Forschungszwecke zurückgegriffen werden muss. Hier spielt FFPE-Gewebe eine entscheidende Rolle, da es sich um das weltweit am meisten verwendete Verfahren der Gewebefixierung handelt und derzeit die Methode der Wahl darstellt. Da Extraktionsverfahren oftmals die Grundlage weiterführender Analysen sind, unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse, dass bestehende Extraktionsverfahren optimiert und besser an FFPE-Gewebe angepasst werden müssen.

Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die DNA-Qualität von FF- und FFPE-Gewebeproben größtenteils nicht durch die Lagerdauer beeinflusst wird, wobei hier ein Zeitraum von 12 Jahren Langzeitlagerung untersucht wurde. Zukünftige Analysen bzgl. des Einflusses einer noch längeren Lagerdauer sollten folgen.

Kongruent zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zeigte sich ferner, dass RNA aufgrund seiner molekularen Struktur instabiler als DNA und somit empfindlicher bzw. anfälliger in Bezug auf präanalytische Faktoren ist. Daher ist die angemessene Dokumentation präanalytischer Faktoren für einen nachhaltigen, qualitätsgesicherten Biobanking-Prozess unerlässlich.