FAGLIG

Monitorering af transplanterede organer ved hjælp af cellefrit DNA

Udvikling, validering og implementering af Droplet Digital PCR-analyse til test af cellefrit DNA

AF:
KRISTINE MATHILDE CLARA LUND JØRGENSEN

Bioanalytiker, Afdeling for Klinisk Immunologi, Blodbanken, Rigshospitalet, & bioanalytikeruddannelsen, Københavns Professionshøjskole

LASSE WITT WARDIL

Bioanalytiker, Afdeling for Klinisk Immunologi, Blodbanken, Rigshospitalet, & bioanalytikeruddannelsen, Københavns Professionshøjskole

LEIF KOFOED NIELSEN

Docent, cand.scient., ph.d., bioanalytikeruddannelsen, Københavns Professionshøjskole

I februar 2021 blev vi af Københavns Professionshøjskole (KP) tilbudt et Forsknings- og Udviklingsforløb (FoU-forløb) i forbindelse med vores bachelorprojekt på bioanalytikeruddannelsen. FoU-forløbet førte til et samarbejde med Afdelingen for Klinisk Immunologi, Blodbanken, på Rigshospitalet, hvor vi har været med til at udvikle og validere en blodprøvebaseret analyse til monitorering af transplanterede organer. Den anvendte metode, Droplet Digital PCR (ddPCR), kvantificerer cellefrit DNA (cfDNA) oprenset fra plasma fra en recipientblodprøve. Analysen er i skrivende stund færdigvalideret og klar til implementering i rutinen.

Transplanterede organer og cfDNA

Ved organtransplantation er det vigtigt med effektiv monitorering af det transplanterede organ. Monitoreringen muliggør en effektiv immunsuppressiv behandling, som mindsker risikoen for afstødning. Transplanterede organer monitoreres i dag primært ved hjælp af biopsier, som er en invasiv diagnostisk procedure, der kan være til stor gene for patienten [1]. Ved at anvende en blodprøvebaseret analyse til monitorering af organtransplantatet kommer vi bort fra en procedure, der skaber ubehag for patienten, og som i sjældne tilfælde giver svære komplikationer. En blodprøvebaseret analyse giver også mulighed for en mere detaljeret monitorering, da der er mulighed for at tage en blodprøve oftere end en biopsi [2,3].

Transplanterede organer frigiver cfDNA til recipientens blodbane, som kaldes donor-deriveret cellefrit DNA (dd-cfDNA). dd-cfDNA kan anvendes som en biomarkør til monitorering af transplantatets tilstand, hvor en stigende fraktion af dd-cfDNA i forhold til recipientens totale cfDNA kan indikere organskade eller begyndende afstødning. Denne blodprøvebaserede analyse har potentiale til at give en tidlig indikation af organskade, og dermed vil det være muligt for klinikerne at justere den immunsuppressive behandling tidligere. I første omgang har metoden potentiale som screeningsmetode, hvilket vil være til gavn for alle patienter, der lever med et transplanteret organ [2,3].

Droplet Digital PCR

Analyseprincippet for *quantitative real-time PCR* (qPCR) og ddPCR er overordnet det samme, dog med én væsentlig forskel; ddPCR kan bestemme koncentrationen af en given *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) uden brug af standardrækker. Ved ddPCR fordeles reaktionsmixet i op til 20.000 droplets før PCR-opformeringen. De droplets, der indeholder en eller flere targetsekvenser, vil fluorescere og dermed betegnes positive. De droplets, der ikke indeholder targetsekvenser, vil ikke fluorescere og dermed betegnes negative (figur 1).

Proportionen af de negative droplets i forhold til antallet af positive droplets benyttes til at udregne koncentrationen af targets ved hjælp af Poisson statistik i softwareprogrammet QX-Manager, som er en del af Bio-Rads ddPCR-system. Den tilfældige fordeling af targets i droplets gør det muligt at opnå en langt større kvantitativ præcision med ddPCR end med qPCR – særligt i tilfælde, hvor der skal påvises lave koncentrationer af cfDNA [3,4].

Udvikling af analysedesign

Vi har taget udgangspunkt i et analysedesign fra Beck et al. [2,3,5], som anvender ddPCR til at monitorere mængden af dd-cfDNA i recipientens blodbane i forhold til mængden af recipientens cfDNA. Det er vist, at analysen kan forudsige organskade i forbindelse med alle organtyper [4].

For at skelne mellem dd-cfDNA og recipientens cfDNA anvendes der 40 PCR-assays bestående af hver deres primerpar og to tilhørende prober. Primerne targeterer området omkring en specifik benign SNP, og de to prober detekterer hver sin allel af SNP'en, som har en *Minor Allele Frequency* (MAF) så tæt på 0,5 som muligt. Ved at anvende 40 assays sikres det, at der statistisk set vil være

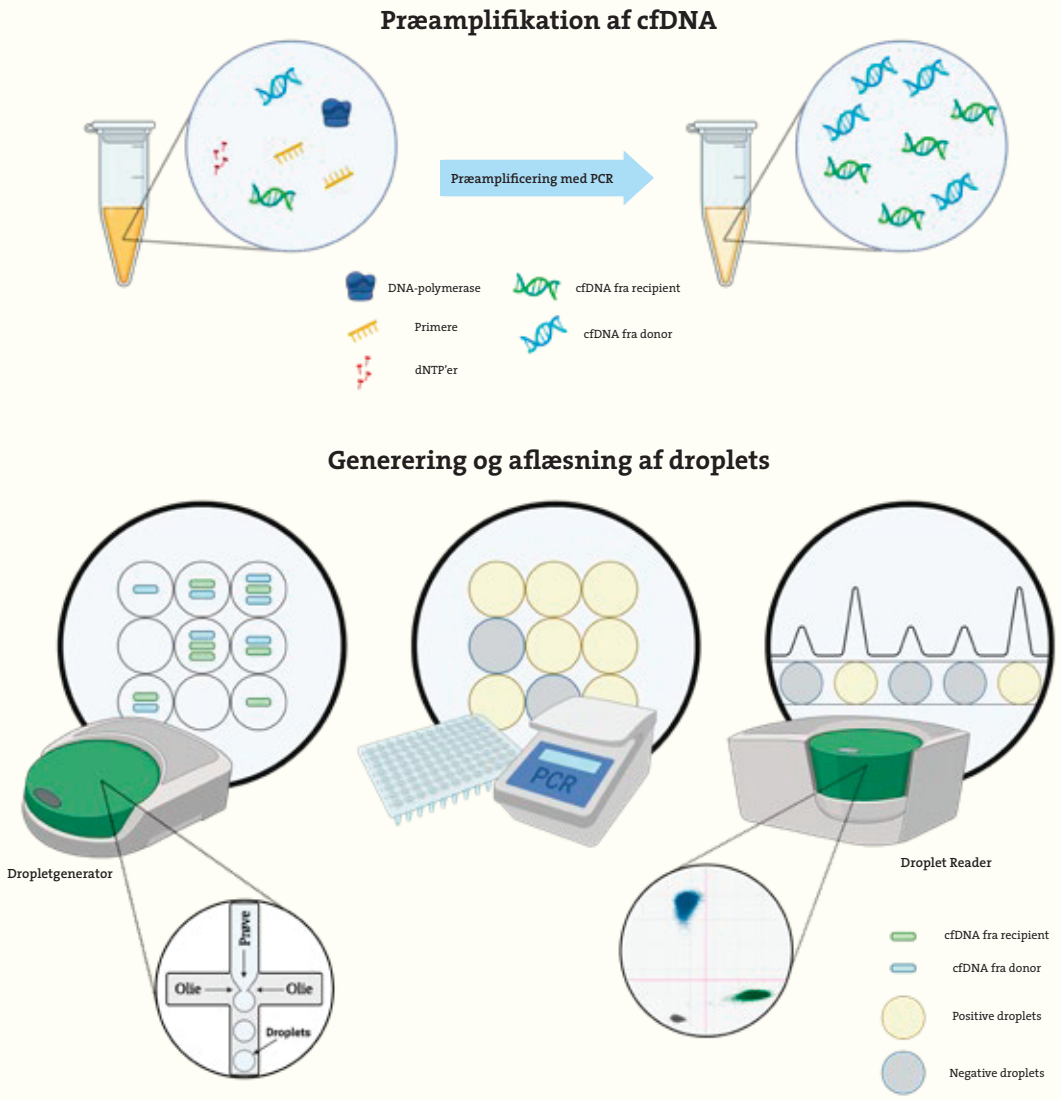


Fig. 1
Illustration af ddPCR-analysedesign. Oprenset cfDNA præamplificeres med PCR for at opnå en kvantificerbar koncentration. Reaktionsmixet fordeles dernæst tilfældigt i ca. 20.000 droplets i dropletgeneratoren, hvorefter der sker en amplificering ved PCR. Afslutningsvis vil dropletreaderen registrere de positive og negative droplets og plotte dem ind i et 2D-amplitudeplot. Illustrationen er udarbejdet med Biorender.com.

ca. fem assays, hvor det vil være muligt at skelne mellem dd-cfDNA og recipientens cfDNA [2,5]. Hvis der medtages færre assays, vil der være en for høj risiko for, at der ikke kan skelnes mellem cfDNA fra donor og recipient.

Da ikke alle assays fra Beck et al. [5] levede op til vores krav, designede vi også vores egne assays. Vi lagde vægt på, at primerne og proberne ikke kunne opformere andre amplikoner end de tilsigtede. Vores primere og prober måtte ikke være længere end 30 basepar (bp), og det endelige PCR-amplikon skulle være så kort som muligt (gennemsnitlig længde på 82 bp), da vi arbejdede med cfDNA, som er relativt korte DNA-fragmenter. Derudover havde vi under designprocessen også øje for GC-procenter, smeltetemperaturer, primer-/probedimers og hairpins. Vi designede i alt 28 primer-/probepar, der i teorien vil kunne fungere som assays i vores setup. Disse blev afprøvet i praksis i laboratoriet.

Ved afprøvningen oprensede vi cfDNA fra 4 mL plasma fra i alt 30 pseudonymiserede donorer. Da cfDNA findes i meget lave koncentrationer i blodbanen, præamplificerede vi derefter det oprensede cfDNA. Præamplificeringen gør det således muligt at opnå en kvantificerbar koncentration (figur 1). Afprøvningen af de enkelte assays foregik ved, at cfDNA fra to af donorerne blev blandet, så de imiterede en organtransplanteret recipientprøve, hvor recipienten er homozygot for den ene SNP i høj koncentration, og organdonoren er homozygot for den anden SNP i lav koncentration (figur 2). Vi endte samlet ud med 40 assays, hvoraf 22 er designet af os, og 18 er fra Beck et al.s analysedesign [5].

ddPCR som en del af rutinen

Med afsæt i Beck et al.s analysedesign [2,3,5] samt adskillige videnskabelige artikler om krav til ddPCR og de tilhørende reagenser fandt vi det mest optimale setup for vores analyse og udarbejdede en udførlig instruks til brug i laboratoriet. For yderligere at validere metoden testede vi metodens detektionsgrænse ved at undersøge, hvor lille en fraktion af dd-cfDNA vi kunne måle i en bestemt baggrund af cfDNA. Detektionsgrænsen blev bestemt til tre cfDNA-kopier per analysereaktion i en baggrund på 130.000 cfDNA-kopier.

Når transplantatet er i en stabil fase, vil frak-

FAKTA

PCR: *Polymerase Chain Reaction* er en molekylærbiologisk teknik, hvor DNA opformeres i en række gentagne cykli.

ddPCR: Droplet Digital PCR er en metode til at udføre digital PCR baseret på en vand-i-olie droplet emulsions-teknologi. Prøvematerialet fordeles tilfældigt i 20.000 droplets, hvor den efterfølgende PCR-amplifikation sker i hver enkelt droplet.

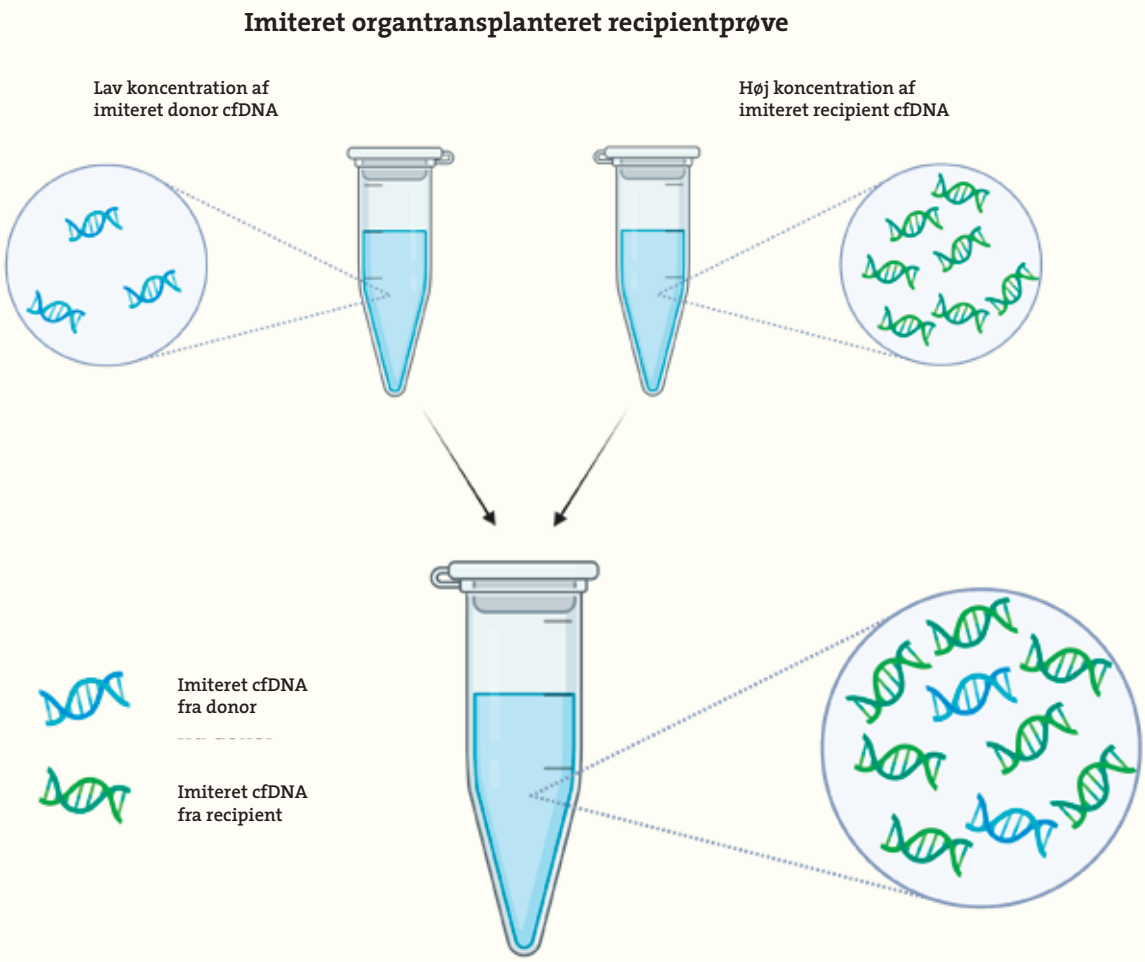
cfDNA: Cellefrit DNA er korte nedbrudte DNA-fragmenter, der frigives til plasma ved celledød.

dd-cfDNA: Donor-deriveret cellefrit DNA er cfDNA fra donororganet, som findes i plasma hos patienter med et transplanteret organ.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* er en enkeltbasevariation i DNA'et, hvor den enkelte base findes i flere variationer. Disse SNP's targeteres ved hjælp af prober, der kan binde sig specifikt til hver basevariation, så disse kan differentieres og kvantificeres.

MAF: *Minor Allele Frequency* er proportionen af den næstmest almindelige af to (nogle gange tre) alleler på et genetisk locus i en population, som spænder fra <1 % til <50 %.

Præamplifikation: En targeteret amplificering af oprenset cfDNA ved hjælp af PCR.



tionen af dd-cfDNA i forhold til recipientens totale cfDNA være omtrent 10 % for levertransplantater, 1 % for nyretransplantater og 0,5 % for hjertetransplantater [2,3]. Derfor var det for os et krav, at metoden skal kunne måle og differentiere dd-cfDNA-koncentrationer svarende til 0,5 % af det totale cfDNA.

Vi har vist, at vi med metoden kan måle og differentiere koncentrationer helt ned til 0,04 %. På den baggrund er analysen nu klar til afprøvning med kliniske prøver, og implementeringen til rutinebrug er igangsat. Den kliniske værdi af monitoreringen af dd-cfDNA hos transplanterede patienter kræver yderligere erfaring, som nu skal opbygges hos klinikerne. Fremtidige studier skal give indsigt i, hvordan klinikerne kan integrere bestemmelsen af dd-cfDNA-niveauet i den generelle monitorering af transplanterede patienter.

Professionsudvikling og samarbejde

Vores FoU-forløb på bioanalytikeruddannelsen har ført til, at vi blev en del af dette spændende forskningsprojekt på Afdeling for Klinisk Immunologi, hvor vi efter endt uddannelse blev tilbudt fastansættelse. For os har FoU-forløbet været en unik mulighed for at afprøve forskningsmiljøet på et tidligt stadie i vores karriere. For afdelingen har FoU-forløbet blandt andet betydet, at de fik rådighed over to fuldtidsstuderende, der kunne indgå i forskningsteamet både til praktisk arbejde og som sparringspartnere.

Det har været en berigende oplevelse, og i den forbindelse vil vi gerne takke KP og Rigshospitalets Afdeling for Klinisk Immunologi, Blodbanken og særligt bioanalytikerunderviser Grethe Risum Krog og seniorforsker Frederik Banch Clausen. Det har været en enestående mulighed og et fantastisk godt samarbejde.

Vi afsluttede vores bachelor i januar 2022, hvor vi vandt KP's formidlingspris og dbio's 1.-pris for bachelorprojekter, hvilket vi er meget beærede over. Vi har fortsat projektarbejdet sideløbende med vores arbejde og kommer til at være medforfattere på en metodeartikel omhandlende projektet. ◻

Fig. 2
Illustration af en imiteret organtransplanteret recipientprøve. Her blandes en lav koncentration af imiteret cfDNA fra donor, som er homozygot for den ene SNP, med en høj koncentration af imiteret cfDNA fra recipienten, som er homozygot for den anden SNP. Illustrationen er udarbejdet med Biorender.com.

KILDER

1. Snyder T, Khush K, Valantine H, Quake S. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011;108(15):6229-6234.
2. Beck J, Bierau S, Balzer S, Andag R, Kanzow P, Schmitz J et al. Digital Droplet PCR for Rapid Quantification of Donor DNA in the Circulation of Transplant Recipients as a Potential Universal Biomarker of Graft Injury. Clinical Chemistry. 2013;59(12):1732-1741.
3. Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U et al. Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. Transplantation Proceedings. 2015;47(8):2400-2403.
4. Stawski R, Stec-Martyna E, Chmielecki A, Nowak D, Perdas E. Current Trends in Cell-Free DNA Applications. Scoping Review of Clinical Trials. Biology. 2021;10(9):906.
5. Beck J, Oellerich M, Schütz E. A Universal Droplet Digital PCR Approach for Monitoring of Graft Health After Transplantation Using a Preselected SNP Set. Methods in Molecular Biology. 2018;335-348.