

Udforskning af potentialet ved flydende biopsi til personlig medicin ved ddPCR

AF:

MARIA ANTÓNIA DE
TAVARES BRAGA

Afdeling for Patologi,
Rigshospitalet.
Københavns Professionshøjskole.
Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa.

MARIANA FILIPA
FARINHA GUDO DOS
SANTOS

Afdeling for Patologi,
Rigshospitalet.
Københavns Professionshøjskole.
Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa.

JOYCE MASABARAKIZA



Afdeling for Patologi,
Rigshospitalet.

KARINA FREDSKILDE



Afdeling for Patologi,
Rigshospitalet.

ANNETTE STENLOV



Københavns Professionshøjskole.

FILIS NECIP



Korrespondenter forfatter.
Afdeling for Patologi,
Rigshospitalet

Ide senere år har forskning inden for biomedicin og teknologiske innovationer forandret vores forståelse og behandling af komplekse sygdomme markant. En væsentlig ny udvikling er indførelsen af flydende biopsi, som kan revolutionere måden, vi diagnosticerer og behandler kræft og andre sygdomme på. Flydende biopsi involverer indsamling og analyse af genetisk materiale fra tumorer (ctDNA og ctRNA) fundet i blod og andre biologiske væsker. Denne metode tillader en dybtgående og dynamisk undersøgelse af tumorens genetiske fingeraftryk.

Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) er en nøgleteknologi i denne nye æra, idet den gør det muligt at kvantificere genetiske markører med stor præcision og følsomhed. Kombinationen af flydende biopsi og ddPCR baner vejen for personlig medicin, hvor behandlinger kan skræddersys til den enkelte patient baseret på dennes unikke genetiske profil.

Dette projekt har til formål at udforske potentialet i flydende biopsi, specifikt ved brug af ddPCR, for at forbedre beslutningsprocesser i personlig medicin. Vi vil kigge på de seneste fremskridt, mulige anvendelser i klinikken og de udfordringer, der endnu skal overvindes for at forme fremtidens diagnose- og behandlingsmetoder.

Udfordringer i behandlingen af kastrationsresistent prostatakræft

Prostatakræft er en af de mest udbredte kræfttyper i Europa og den tredje mest almindelige dødsårsag blandt europæiske mænd. Omkring 80-90 % af tilfældene er drevet af androgener, og derfor inkluderer de første behandlingstrin typisk androgen ablationsterapi for at reducere androgenniveauer og bremse transkriptionen af androgenreceptorer (1).

Patienter med primær prostatakræft har generelt en god prognose med næsten 100 % overlevelsesrate efter fem år. Denne rate falder dog til 30 % for patienter med metastaseret kræft. Desværre varierer patienternes reaktion på androgen ablationsterapi, og 20-30 % oplever fortsat kræftprogression. Sygdommens

genopblussen på trods af lave testosteronni-veauer indikerer en udvikling mod kastrationsresistent prostatakræft (CRPC) (1).

CRPC er en avanceret form for prostatakræft, som ikke reagerer på hormonbehandlinger og fører til ukontrolleret tumorvækst. Dette betyder, at patienter med CRPC risikerer, at tumoren metastaserer.

AR-V7 og AR-FL som prædictive markører for metastaseret prostatakræft

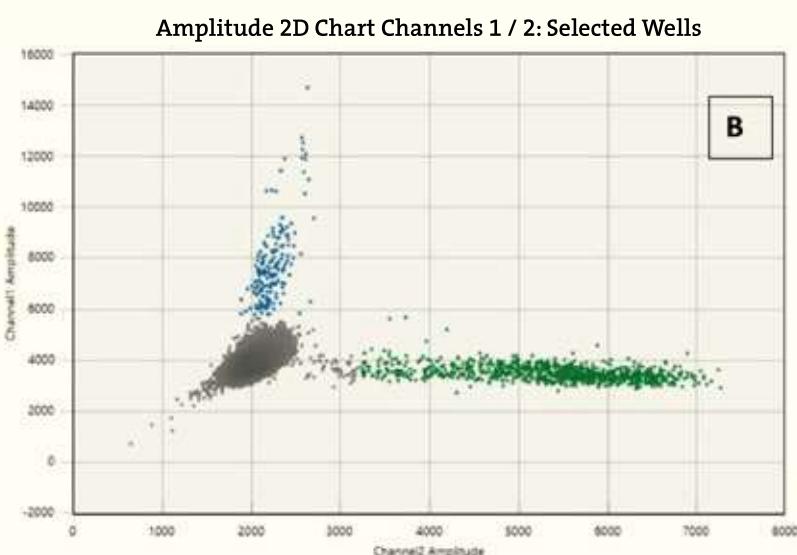
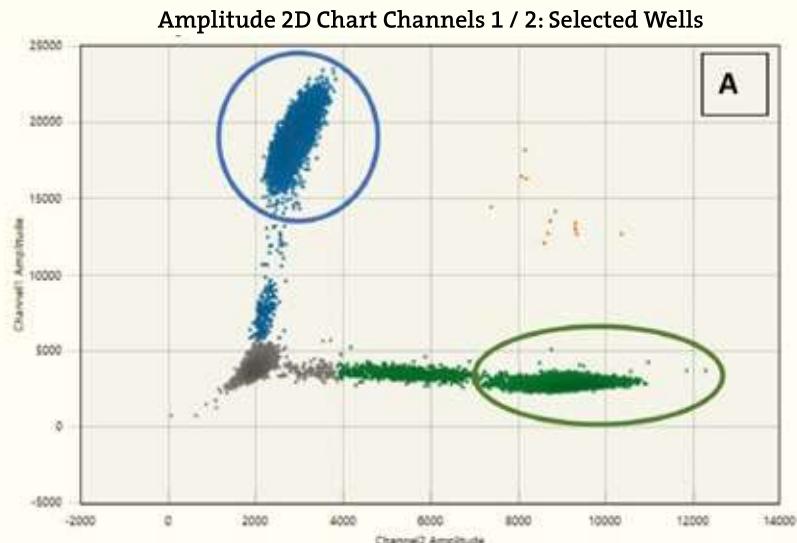
Forskning har vist, at ændringer i genet for androgenreceptoren (AR) er afgørende i udviklingen og progressionen af prostatakræft (2). Flere varianter af AR er fundet i prøver fra CRPC-patienter, hvoraf nogle mangler et bestemt domæne, hvilket fører til konstant aktivering af AR-signaler. Særligt fremtrædende i CRPC er AR variant 7 (AR-V7), der skyldes alternativ splejsning af den normale AR fuldlængde (AR-FL) mRNA. AR-V7 er blevet identificeret som en prædictiv markør for CRPC og har væsentlig klinisk betydning i valget af behandling og i forståelsen af resistens mod behandlinger (3). Flydende biopsi, som kan detektere og kvantificere AR-V7, kan således vejlede om målrettet behandling for patienter med metastaseret prostatakræft.

Flere studier har vist, at AR-V7 kan påvises ved hjælp af en teknik kaldet realtids polymerasekædereaktion (RT-PCR). Denne metode anvendes på RNA udvundet fra forskellige typer prøver, herunder formalinfikserede, paraffinindlejrede prostatakræftpøver (FFPE), cirkulerende tumorceller (CTC'er), plasma-eksosomer, fuldblod og mononukleære celler i perifert blod (3). Alternativt kan AR-V7 og AR-FL mRNA kvantificeres direkte i perifert fuldblod ved hjælp af flydende biopsi, hvilket er mindre indgribende end traditionelle vævsbiopsier og sparer tid i den indledende analysefase.

Når det kommer til detektion og kvantificering af genetisk materiale, er der mange ligheder mellem ddPCR og RT-PCR. Men ddPCR skiller sig ud ved sin evne til at identificere selv meget små mængder af genetisk materiale, hvilket forbedrer detektionsgrænsen sammenlignet med RT-PCR (4).

FIGUR 1: Todimensionelt spredningsplot af ddPCR-analyse

Plottet viser tælling af PCR-positivt og PCR-negativt dråber og absolut kvantificering af mål-DNA fra QX 200-dråbelæseren. AR-V7 er præsenteret ved blå dråber. De grønne dråber indeholder AR-FL. Dråberne, der indeholder begge androgenreceptorskabeloner, er orange, og den grå klynge svarer til de tomme dråber. Det skal bemærkes, at orange dråber er fra de positive kontroller. AR-V7- og AR-FL-positive kontroller er cirklet i henholdsvis blå og grøn (A). Klynger repræsenterer kun de raske donorers prøver (B).



Baseret på undersøgelsen af Seitz et al. (3), hvor et assay til kvantificering af AR-V7 og AR-FL blev etableret, er målet med vores projekt at verificere og validere dette assay til en standar-diseret protokol til direkte kvantificering af AR-V7 og AR-FL mRNA-niveauer i perifert fuldblod. Vi har også målt niveauet af disse genetiske markører i blodprøver fra 88 raske mænd for at etablere en baseline eller referenceværdi. Formålet er at fastsætte et maksimalt niveau for AR-V7, som kan bruges i kliniske sammenhænge og fremtidige studier til at skelne mellem høje og lave niveauer af AR-V7 mRNA i patientprøver.

Metodedesign

Kohorten i vores studie omfattede 88 sundhedsgodkendte donorer fra det danske forsvar, som alle opfyldte kravene til at blive betragtet som raske ifølge standardsundhedsundersøgelser. Desuden inkluderede studiet 10 patienter, der var diagnosticeret med benign prostatahyperplasi (BPH).

cDNA blev syntetiseret ved hjælp af qScript XLT cDNA SuperMix fra Quantabio. Vi brugte et DeNovix DS-11 spektrofotometer til at kvantifi-

cere og vurdere renheden af vores cDNA-prøver.

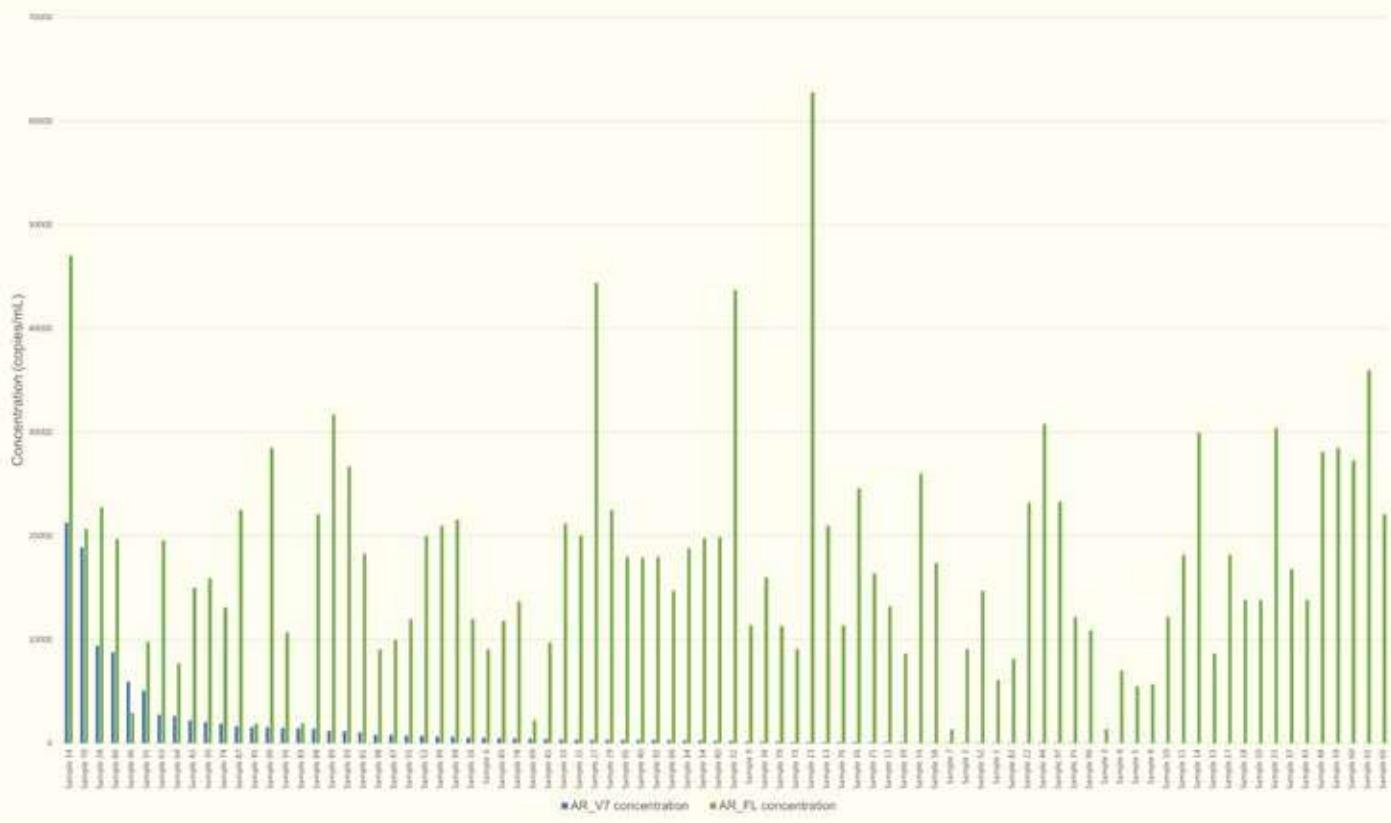
Under dråbegenereringen til PCR-reaktionen inkluderede vi cDNA-prøver eller positive kontrolprøver, AR-V7- og AR-FL-primere fra Bio-Rad samt Bio-Rad ddPCR SuperMix. De positive kontrolprøver, som var syntetisk DNA indeholdende de relevante sekvenser, blev købt fra Integrated DNA Technologies. Til aflæsning og kvantificering brugte vi Bio-Rads QX 200-dråbelæser, der tæller PCR-positive og PCR-negative dråber.

Vigtigheden af kvalitetsvurdering ved kvantificering af lave variantniveauer

Vi evaluerede den analytiske validitet af vores assay ved at oprense RNA og derefter kvantificere AR-V7 og AR-FL ved hjælp af ddPCR. Alle prøver havde et absorbansforhold på 260/280 mellem 1.65 og 2.50. For at sikre kvaliteten af ddPCR-resultaterne udførte vi dobbeltmålinger af både intra- og interkørsler. Hver ddPCR-kørsel indeholdt både AR-V7- og AR-FL-positive kontroller samt blindprøver. Resultaterne er præsenteret i et todimensionelt spredningsplot i figur 1, der demonstrerer forskellige klynger

FAGLIG

FIGUR 2: Kvantificering af AR-V7 og AR-FL mRNA-niveauer hos raske patienter ved ddPCR



AR-V7 og AR-FL mRNA-niveauer i fuldblod kvantificeret ved ddPCR for 98 donorer for at bestemme tumoruafhængig AR-V7- og AR-FL-baggrundsekspresion. Prøve 1 til 10 tilhører patienter med benign prostatahyperplasi, og prøve 11 til 98 tilhører gruppen med raske mænd.

FIGUR 3: Fraktion af AR-V7-transkripter over total androgenreceptor (AR)



Den stipede linje svarer til afskæringen og angiver en brøkdel af 0,67 % AR-V7-transkripter over total AR (AR-V7 + AR-FL).



visualiseret i en ddPCR-kørsel. Vi anvendte blindprøver for at overvåge og minimere risikoen for falsk positive reaktioner, som kunne stamme fra eksempelvis produktoverførsel, krydkontaminering eller uspecifik binding (5).

Vores assay er designet til at detektere AR-V₇, som findes i lave mængder i raske individer. Derfor var det vigtigt at inkludere en kontrol, der kun indeholdt AR-V₇, og en kontrol med den normale AR-FL-sekvens. ddPCR-teknologien muliggør kvantificering af både syntetisk og humant DNA, hvilket skaber separate klynger for hver androgenreceptor – en til positive kontroller og den anden til prøveresultaterne. Dette skyldes, at syntetiske kontroller transmitterer et højere fluorescensamplitudesignal end kohorteprøverne. Derudover kræver ddPCR en tærskel for at skelne positive fra negative partitioner.

Kvantificering og korrelation af AR-V₇ og AR-FL i perifert fuldblad ved ddPCR

Vi kvantificerede AR-V₇- og AR-FL-niveauer i perifere fuldbloodsprøver fra de 88 raske donorer og 10 BPH-patienter. AR-FL blev fundet i alle donorer, og 76 af dem havde også påviselige AR-V₇-niveauer (se figur 2). Resultaterne viser, at raske mænd udtrykker målbare AR-V₇ mRNA-niveauer, hvilket understreger betydningen af at etablere en klar baseline for AR-V₇-koncentrationer i blodet. Dette vil hjælpe med at adskille normale niveauer fra dem, der kan indikere sygdom. Vores data viste ingen korrelation mellem AR-V₇ og AR-FL, hvilket understreger vigtigheden af at måle begge.

Interessant nok fandt vi ingen markante for-

skelle i AR-V₇- og AR-FL-niveauer mellem raske individer og BPH-patienter. Dette er bemærkelsesværdigt, da tidligere studier har foreslået en sammenhæng mellem BPH og øget risiko for prostatakræft, som begge er stærkt påvirket af AR-signalering (6). AR's rolle i denne sammenhæng er endnu ikke klarlagt.

Etablering af baseline for AR-V₇

For at etablere en klar reference for AR-V₇ fulgte vi den metode, som Seitz et al. anvendte (3). Vi skabte en baseline baseret på den højeste AR-V₇-fraktion, som er vist i figur 3. Vi fastsatte denne baseline til en cutoff-værdi på 0,67 %. Til sammenligning anvendte Seitz et al. 28 raske mandlige deltagere og etablerede en baseline med en cutoff på 0,6 % for AR-V₇-transkriptor i forhold til det totale AR-niveau. Ved at inkludere en større gruppe deltagere i vores projekt kan vi understøtte en mere præcis baseline. Denne nye cutoff-værdi på 0,67 % vil i fremtidige studier og kliniske applikationer indikere, at niveauer af AR-V₇ over denne grænse må betragtes som høje.

AR-V₇ som biomarkør for behandlingsvalg ved metastaseret CRPC

Vores resultater viser, at AR-V₇ kan bruges som en prædiktiv markør for, hvordan patienter med metastaseret kastrationsresistent prostatakræft vil reagere på nyere AR-rettet terapi. Eftersom AR-V₇ bidrager til behandlingsresistens, kan vores validerede assay hjælpe med at guide behandlingen for disse patienter, så de undgår unødvendige behandlinger, som alligevel ikke er effektive på grund af resistens. □

KILDER

1. Dehm, S.M., & Tindall, D.J. (2006). Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 99(2), 333-344.
2. Gelmann E.P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(13), 3001-3015.
3. Seitz, A.K., Thoene, S., Bietenbeck, A., Nawroth, R., Tauber, R., Thalgott, M., Schmid, S., Secci, R., Retz, M., Gschwend, J.E., Ruland, J., Winter, C., & Heck, M.M. (2017). AR-V7 in Peripheral Whole Blood of Patients with Castration-resistant Prostate Cancer: Association with Treatment-specific Outcome Under Abiraterone and Enzalutamide. *European urology*, 72(5), 828-834.
4. Taylor, S.C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable non-sense to publication quality data. *Scientific reports*, 7(1), 2409.
5. dMIQE Group, & Huggett, J.F. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical chemistry*, 66(8), 1012-1029.
6. Vickman, R.E., Franco, O.E., Moline, D.C., Vander Giard, D.J., Thumbikat, P., & Hayward, S.W. (2020). The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian journal of urology*, 7(3), 191-202.