



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΨΗΦΙΑΚΗΣ PCR ΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ (DROPLET DIGITAL PCR) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ KRAS G12C ΣΤΟ ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ DNA ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.

Μιχαηλίδου Κλείτα¹, Κουτουλάκη Χαρά¹, Καλαπανίδα Δέσποινα², Βορριάς Ελευθέριος², Βαρδάκης Νικόλαος², Μαυρουδής Δημήτριος^{1,2}, Αγγελάκη Σοφία^{1,2}
¹Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, ²Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η ανάπτυξη μεθοδολογίας ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR) για την ποσοτικοποίηση του φορτίου της μετάλλαξης KRAS G12C (Κλάσμα μεταλλαγμένων αλληλομόρφων; MAF) στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA), ασθενών με μεταστατικό μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα (ΜΜΚΠ). Επιπλέον στόχος μας ήταν η ανίχνευση της KRAS G12C χρησιμοποιώντας ddPCR στο cfDNA που απομονώθηκε από 20 δείγματα πλάσματος ασθενών με ΜΜΚΠ και γνωστή μετάλλαξη G12C στο δείγμα ιστού όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger.

Μέθοδοι: Σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές και ιχνηθέτες TaqMan και έγινε βελτιστοποίηση των αντιδράσεων ddPCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση της G12C και της wild-type αλληλουχίας του εξωνίου 2 του KRAS.

Προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου με πειράματα ελέγχου. Δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν από 20 ασθενείς με ΜΜΚΠ και με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη KRAS G12C στον ιστό. Η ανίχνευση της KRAS G12C στα δείγματα cfDNA έγινε με την μέθοδο ddPCR και στον ιστό με αλληλούχιση κατά Sanger.

Αποτελέσματα: Το όριο ανίχνευσης της ddPCR μεθόδου που αναπτύχθηκε προσδιορίστηκε στο 0.2% (MAF). Από τα 20 δείγματα cfDNA που αναλύθηκαν, η μετάλλαξη KRAS G12C ανιχνεύτηκε σε 7 (35%) από αυτά, με MAF από 1,03% μέχρι 27,20%.

Συμπεράσματα: Η χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου ddPCR παρέχει ένα ιδανικό συνδυασμό ταχύτητας, ειδικότητας και ευαισθησίας για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση του φορτίου της μετάλλαξης KRAS G12C στο cfDNA ασθενών με ΜΜΚΠ.

CONTACT

Σοφία Αγγελάκη MD, PhD
Αν. Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας,
Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης,
Παθολογική Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
Email: agelakisofia@gmail.com
Phone: 2810392438

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μετάλλαξη c.34G>T (p.G12C) στο γονίδιο KRAS εμφανίζεται περίπου στο 14% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Η πρόσφατη ανάπτυξη ειδικών αναστολέων για τη θεραπευτική στόχευση της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης KRAS G12C, ενίσχυσε το ενδιαφέρον για τη μελέτη της κλινικής σημασίας της συγκεκριμένης μετάλλαξης για τους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) [1,2,3]. Ωστόσο, στο μεταστατικό ΜΜΚΠ, ο καρκινικός ιστός δεν είναι πάντοτε προσβάσιμος, ή/και το διαθέσιμο δείγμα ιστού είναι ανεπαρκές για εκτενή χαρακτηρισμό, ενώ η λήψη επαναλαμβανόμενων βιοψιών είναι δυσχερής [4]. Προς αυτή τη κατεύθυνση, η γρήγη βιοψία και ειδικότερα το ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (cfDNA), αποτελεί μια εναλλακτική μη επεμβατική πηγή για την ανάλυση του γενετικού προφίλ του όγκου, που κερδίζει συνεχώς έδαφος στην έρευνα, αλλά και την καθημερινή πρακτική της ογκολογίας, με σαφή πλεονεκτήματα έναντι της βιοψίας ιστού [5].

Η ανάλυση του cfDNA, αποτελεί όμως πρόκληση καθώς τα μόρια cfDNA είναι κατακερματισμένα (μέγεθος μορίων ~134-144bp) από τη φύση τους, και «αραιώνονται» από το κυκλοφορούν ελεύθερο DNA μη καρκινικής προέλευσης [6]. Η τεχνολογία ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR), είναι ένα ισχυρό εργαλείο που έχει τη δυνατότητα να ικανοποιήσει την ανάγκη για ταχεία, και εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση μεταλλάξεων κλινικής σημασίας, όπως η KRAS G12C, στο cfDNA των ασθενών με ΜΜΚΠ, με συχνότητες μεταλλαγμένων αλληλομόρφων (MAF) τόσο χαμηλές όσο 0.01% [7].

ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάπτυξη μεθοδολογίας ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φορτίου της μετάλλαξης KRAS G12C (Κλάσμα μεταλλαγμένων αλληλομόρφων; MAF) στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA), ασθενών με μεταστατικό ΜΜΚΠ και με γνωστή KRAS G12C μετάλλαξη στον ιστό.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

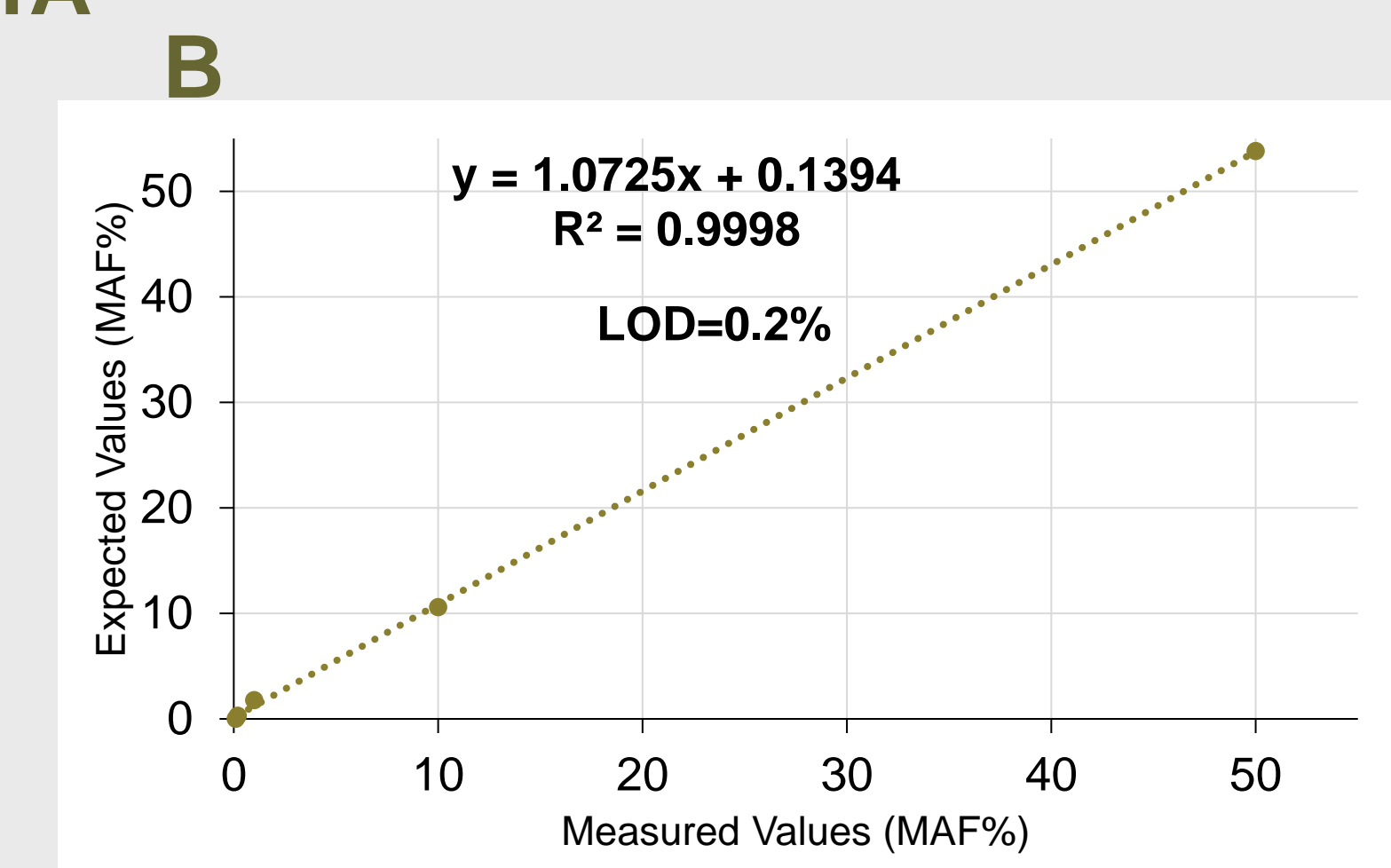
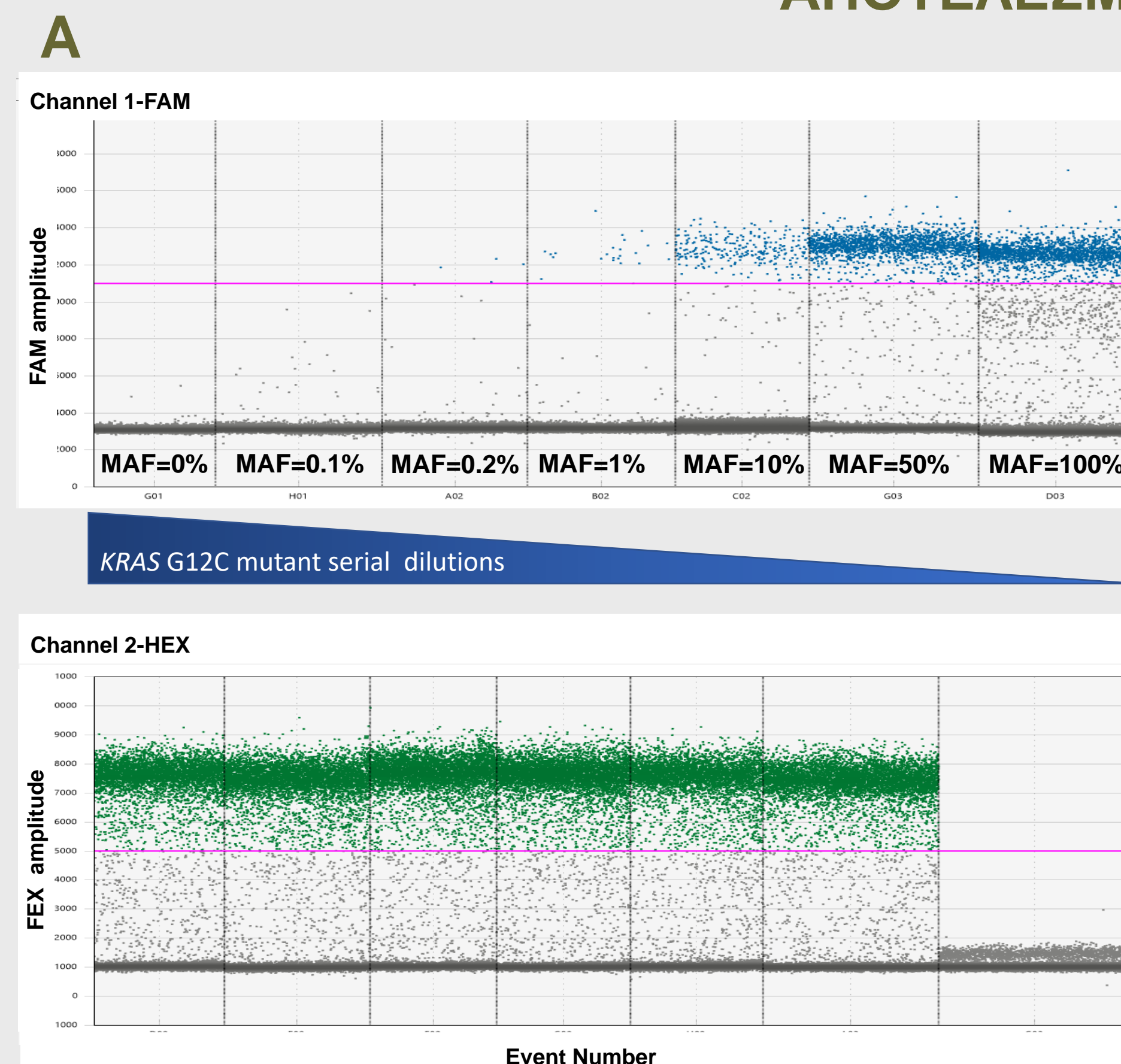
Συλλογή βιολογικών δειγμάτων: Δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν από 20 ασθενείς με ΜΜΚΠ και με γνωστή μετάλλαξη KRAS G12C στον ιστό όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Sanger. Οι ασθενείς λάμβαναν θεραπεία πρώτης γραμμής στη Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεση τους για τη συμμετοχή στη μελέτη.

Απομόνωση cfDNA από δείγματα πλάσματος: Το cfDNA απομονώθηκε από 2 mL πλάσματος με τη χρήση ειδικού kit αντιδραστηρίων και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση φθορισμομέτρου τύπου QUBIT. Το cfDNA που απομονώθηκε από τα δείγματα πλάσματος των ασθενών με ΜΜΚΠ αναλύθηκε με τη μέθοδο ddPCR.

Ανάπτυξη υπερευαίσθητης μεθοδολογίας ddPCR για την ανάλυση της KRAS G12C μετάλλαξης: Σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές και κατάλληλα σημασμένοι ανιχνευτές (probes) για τη ταυτόχρονη μελέτη της KRAS G12C και της wild type (WT) αλληλουχίας του εξωνίου 2 του KRAS στα δείγματα cfDNA. Βελτιστοποιήθηκε η θερμοκρασία υβριδοποίησης και η συγκέντρωση των εκκινητών και των ανιχνευτών. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης και η ειδικότητα της μεθόδου με πειράματα ελέγχου χρησιμοποιώντας σειριακές αραιώσεις της μεταλλαγμένης αλληλουχίας σε υπόβαθρο KRAS WT αλληλουχίας σε συγκεντρώσεις 0.1%, 0.2%, 1%, 10%, 50%, και 100%. Η αντίδραση ddPCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad).

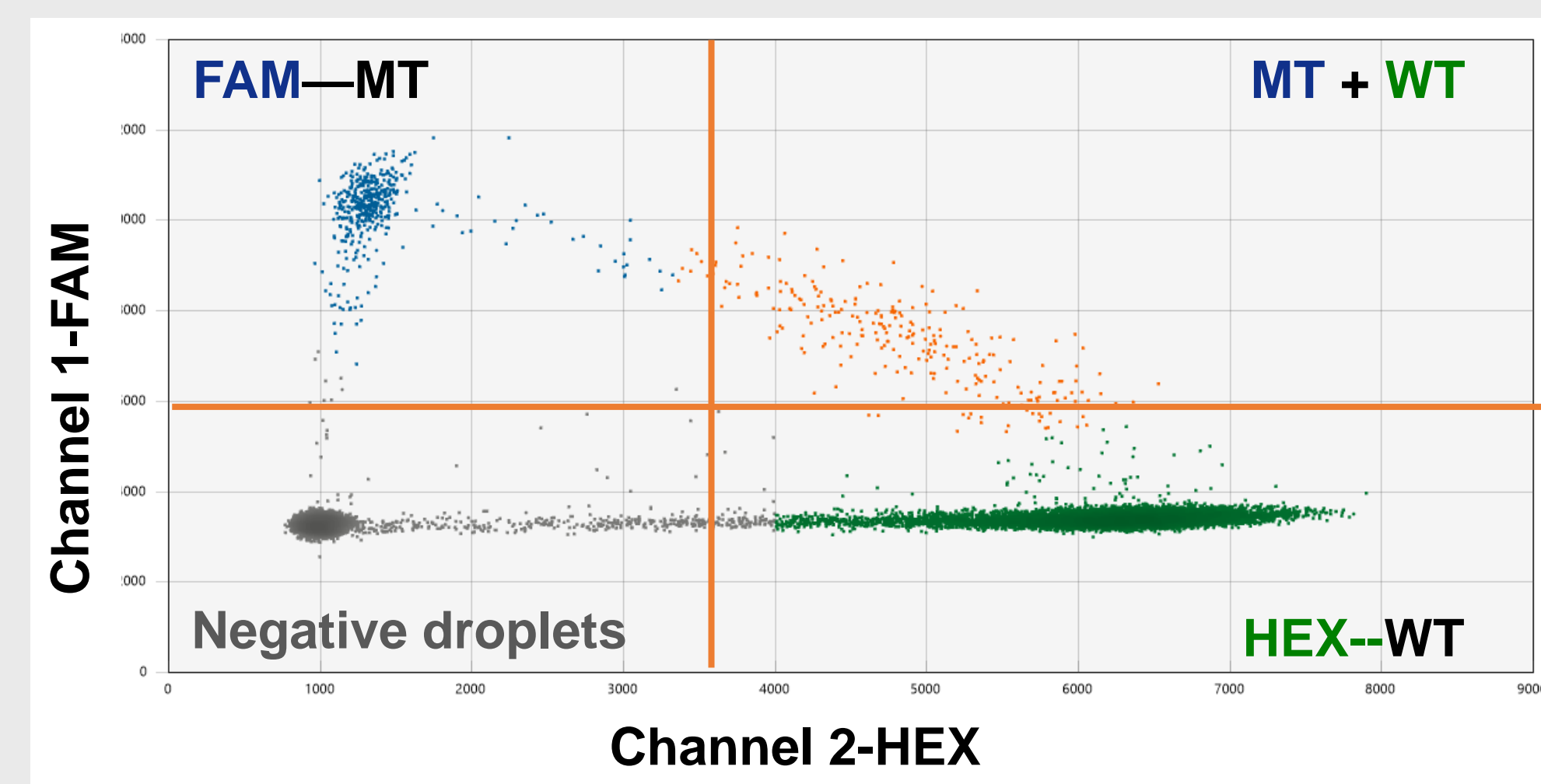
Ανάλυση αποτελεσμάτων: Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό QuantaSoft Analysis Pro για τον προσδιορισμό του φορτίου σε copies/mL πλάσματος της G12C μετάλλαξης σε κάθε δείγμα και για τον υπολογισμό του MAF.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 1. Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου ddPCR με πειράματα ελέγχου και σειριακές αραιώσεις τμημάτων DNA (gblock) με τη μετάλλαξη 34G>T (G12C). **A.** 1D scatter plot των σειριακών αραιώσεων της KRAS G12C σε υπόβαθρο WT αλληλουχίας σε συγκεντρώσεις MAF από 0.1%, 0.2%, 1%, 10%, 50%, μέχρι και 100%. Η ανίχνευση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας G12C του KRAS γίνεται με σημασμένους με FAM ανιχνευτές και της wild-type αλληλουχίας του κωδικονίου 12 του εξωνίου 2 του KRAS με σημασμένους με HEX ανιχνευτές. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίστηκε στο 0.2% MUT/WT. **B.** Dynamic range of the ddPCR-based assay. Το R² υποδηλώνει γραμμική συσχέτιση μεταξύ του προσδιορισθέντος και θεωρητικού MAF.

Εικόνα 2. 2D scatter plot της ταυτόχρονης (multiplex) ανίχνευσης της G12C μετάλλαξης και της wild-type αλληλουχίας του εξωνίου 2 του KRAS σε ένα δείγμα ΜΜΚΠ που φέρει τη σωματική μετάλλαξη στο cfDNA σε ετεροζυγωτία.



KRAS G12C Ιστός	KRAS G12C Πλάσμα	Αρ. Ασθενών (Ποσοστό)
MUT	MUT	7 (35%)
MUT	WT	13 (65%)
Σύνολο		20

Πίνακας 1. Από τους 20 ασθενείς με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στον ιστό με Sanger, οι 7 (35%) είχαν ανιχνεύσιμη μετάλλαξη και στο πλάσμα όπως ελέγχθηκαν με τη ddPCR, με MAF από 1.03% μέχρι 27.20%. Στους υπόλοιπους 13 (65%) ασθενείς με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στον ιστό, δεν ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη KRAS G12C στο αντίστοιχο δείγμα πλάσματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Τα προκαταρκτικά μας αποτελέσματα δείχνουν ότι η ddPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ευαίσθητη ανίχνευση της KRAS G12C σε ελεύθερο κυττάρων κυκλοφορούν καρκινικό DNA από ασθενείς με ΜΜΚΠ.
- ✓ Το όριο ανίχνευσης της αναπτυχθείσας μεθόδου φτάνει το 0,2% MUT/WT.
- ✓ Από τους 20 ασθενείς με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη KRAS G12C στον ιστό με Sanger, οι 7 (35%) είχαν ανιχνεύσιμη μετάλλαξη και στο πλάσμα όπως ελέγχθηκαν με τη ddPCR
- ✓ Η χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου ddPCR παρέχει ένα ιδανικό συνδυασμό ταχύτητας, ειδικότητας και ευαισθησίας για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση του φορτίου της μετάλλαξης KRAS G12C στο cfDNA ασθενών με ΜΜΚΠ.

Βιβλιογραφία

- Gragnano, G., et al., Performance evaluation of a fully closed real-time PCR platform for the detection of KRAS p.G12C mutations in liquid biopsy of patients with non-small cell lung cancer. J Clin Pathol, 2021.
- Michaelidou, K., et al., Detection of KRAS G12/G13 Mutations in Cell Free-DNA by Droplet Digital PCR, Offers Prognostic Information for Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. Cells, 2020. 9(11).
- Hong, D.S., et al., KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. N Engl J Med, 2020. 383(13): p. 1207-1217.
- Filipska, M. and R. Rosell, Mutated circulating tumor DNA as a liquid biopsy in lung cancer detection and treatment. Mol Oncol, 2021.
- Demuth, C., et al., Measuring KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Droplet Digital PCR and Next-Generation Sequencing. Transl Oncol, 2018. 11(5): p. 1220-1224.
- Demuth, C., et al., Measuring KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Droplet Digital PCR and Next-Generation Sequencing. Transl Oncol, 2018. 11(5): p. 1220-1224.
- McEvoy, A.C., et al., Droplet Digital PCR for Mutation Detection in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Melanoma Tissues: A Comparison with Sanger Sequencing and Pyrosequencing. J Mol Diagn, 2018. 20(2): p. 240-252.

Ευχαριστίες

Μέρος της παρούσας εργασίας χρηματοδοτήθηκε από την Εταιρεία Ογκολόγων - Παθολόγων Ελλάδας (Ε.Ο.Π.Ε.)