

Liquid biopsy

Multi-target ddPCR Assays zur Detektion von *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen

SASKIA HUSSUNG^{1,2}, RALPH FRITSCH^{1,2}

¹ ABTEILUNG FÜR INNERE MEDIZIN I (HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND STAMMZELL-TRANSPLANTATION), UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG

² KLINIK FÜR MEDIZINISCHE ONKOLOGIE UND HÄMATOLOGIE, UNIVERSITÄTSSPITAL ZÜRICH, SCHWEIZ

Detection and quantification of tumor-derived mutations in cell-free DNA (cfDNA) holds great potential for non-invasive tumor diagnostics and molecular monitoring. We developed highly sensitive discriminatory multi-target digital droplet PCR (ddPCR) assays covering 14 *KRAS* and *NRAS* hotspot mutations.

DOI: 10.1007/s12268-020-1463-6

© Die Autoren 2020

■ Die Detektion und Analyse zellfreier Nukleinsäuren, die aus dem Plasma und anderen Körperflüssigkeiten extrahiert werden können, besitzt großes Potenzial für die molekulare Diagnostik und nicht-invasive Überwachung von Tumorpatienten [1–4]. Aufgrund der zentralen Beteiligung an der Entstehung zahlreicher Neoplasien ist insbesondere der Nachweis und die Quantifizierung von *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen in zellfreier DNA im Plasma zur Krebsfrüherkennung von großem wissenschaftlichem Interesse [5, 6]. Eine große Anzahl an Studien beschäftigt sich auch mit der Bedeutung der Detektion zellfreier DNA als Indikator für minimale Resterkrankung (MRD) nach Tumorresektion [7, 8] und dem Potenzial als prognostischer und prädiktiver Biomarker im fortgeschrittenen Tumorstadium [2].

Mutationsdetektion in zellfreier DNA (cfDNA) mittels ddPCR

Aufgrund der typischerweise in frühen Krankheitsstadien oder MRD-Situationen niedrigen Allelfrequenzen mutierter, von Tumorzellen stammender DNA und der oftmals begrenzten Menge an Input-DNA, erfordert die Analyse zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) Assaysysteme mit sowohl hoher Sensitivität als auch ausreichender Spezifität. Unter den gen- und mutationsspezifischen PCR-basierten Technologien zeichnet sich die digitale Tröpfchen-PCR (*droplet*

digital PCR, ddPCR) durch große Robustheit, hohe Präzision und exzellente quantitative Auflösung bei vergleichsweise niedrigen Assaykosten aus [9]. Durch ihre Eigenschaften eignet sie sich somit ideal für repetitive Probenmessungen während des Krankheits- und Therapieverlaufs [1–4].

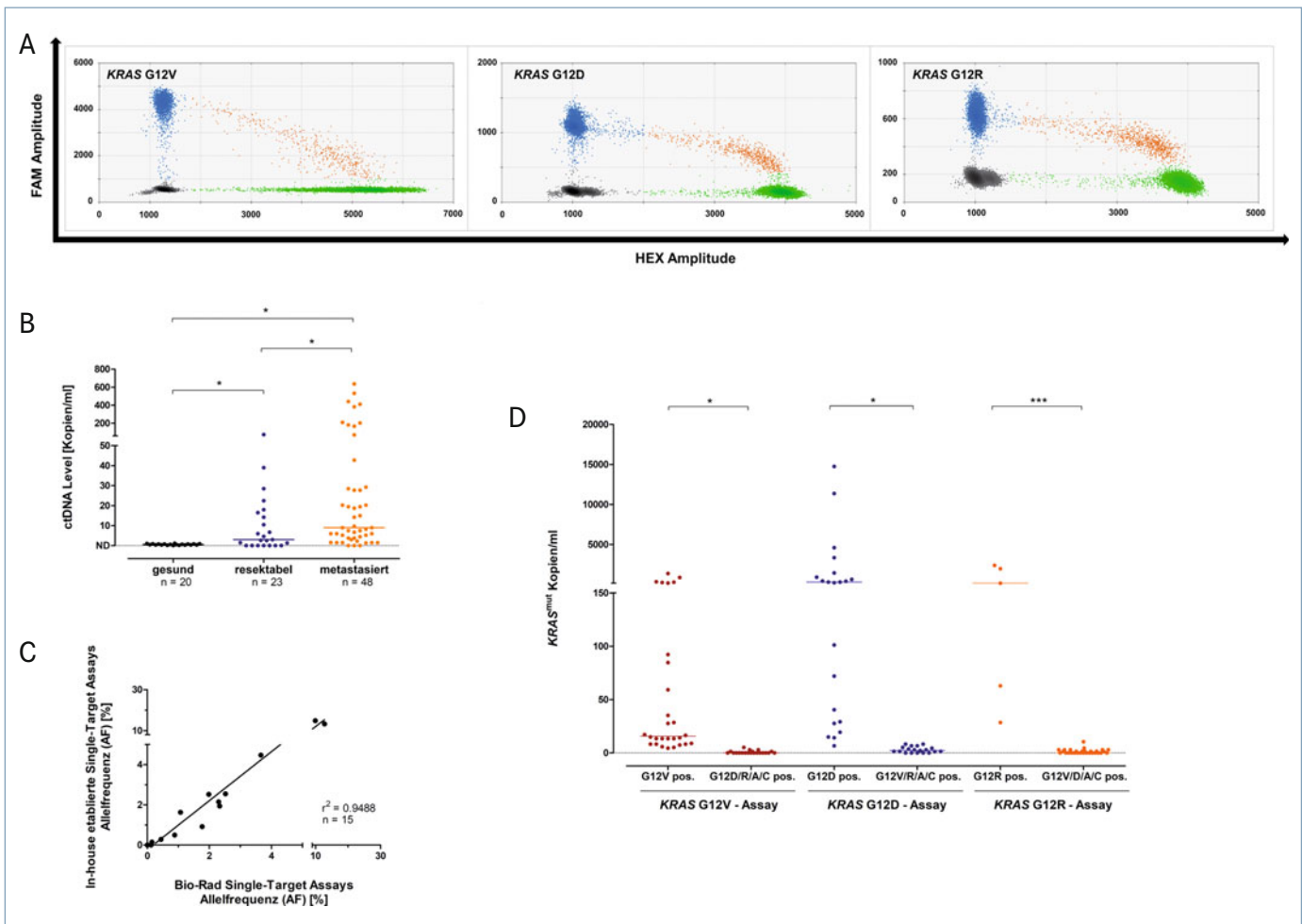
Technisch basiert die ddPCR auf der Dispersion der zu analysierenden Probe in Tausende von nanolitergroßen Tröpfchen mit anschließender PCR-Amplifikation in den Einzeltröpfchen [10]. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt mittels Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Sonden. Typischerweise sind für die Mutationsdetektion in cfDNA jeweils eine mutationsspezifische und eine Wildtypsonde im Assay mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung, wodurch die Einzeltröpfchen nach Reaktionsablauf entsprechend der gebundenen Sonde fluoreszieren. Aktuell sind die meisten verfügbaren ddPCR-Systeme auf den gleichzeitigen Nachweis von zwei oder drei Fluoreszenzfarbstoffen beschränkt, was ihre Multiplexing-Kapazität für die cfDNA-Analyse limitiert [10]. Es ist grundsätzlich möglich, mehrere mutationsspezifische Sonden mit identischer Fluoreszenzmarkierung zu mischen, um die gleichzeitige Detektion mehrerer Mutationen zu ermöglichen und damit Proben zu screenen. Dieses Prinzip wird in kommerziell erhältlichen *KRAS*- und *NRAS*-ddPCR Screening-Assays eingesetzt. Diese Assays erlauben

dann allerdings nicht den Rückschluss, welche Mutation detektiert wird, was die Aussagekraft solcher Assays erheblich einschränkt. Zudem haben kommerzielle Screening Assays durch die Mischung zahlreicher identisch markierter DNA-Sonden im Vergleich zu mutationsspezifischen Einzelassays auch eine erheblich niedrigere Sensitivität und Spezifität [11].

Vor diesem Hintergrund entwickelten wir diskriminatorische *multi-target* Assays, die mit deutlich besserer Sensitivität und Spezifität in der Lage sind, jeweils mehrere *KRAS*- oder *NRAS*-SNVs (Einzelnukleotid-Polymorphismen) zu detektieren, identifizieren und quantifizieren. Hierzu wurden zunächst mutationsspezifische Einzelassays entwickelt und optimiert, die dann individuell optimiert zu Screening Assays assembliert wurden. Die Funktionalität der Assays validierten wir an rekombinanter DNA und Patientenproben [12].

Mutationsspezifische *single-target* ddPCR Assays für *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen

Mithilfe mutationsspezifischer *locked nucleic acid* (LNA)-basierten Sonden entwickelten wir zunächst ddPCR-Assays für die 14 häufigsten *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen. Diese Assays wurden für das Bio-Rad QX100/200 System optimiert und anhand zahlreicher Plasmaproben von gesunden Probanden und Pankreaskarzinompatienten klinisch validiert (**Abb. 1**, [12]). Zur Bestimmung der Assaysensitivität (*limit of detection*, LOD) wurden zahlreiche Replikate einer Probe, von der bekannt ist, dass sie eine geringe Konzentration enthält, gemessen und das LOD entsprechend der Formel $LOD = LOB + 1.645 \cdot (SD_{\text{low concentration sample}})$ [13] berechnet. Das Limit of Blank (LOB) wurde hierbei durch die Analyse von zellfreier DNA extrahiert aus Plasmaproben von gesunden Probanden gemäß $LOB = \text{mean}_{\text{blank}} + 1.645 \cdot (SD_{\text{blank}})$ [13] kalkuliert. Die Sensitivitäten der *single-target* Assays lagen zwischen 0,0015 und 0,069 Prozent Allelfrequenz [12]. Nach zunächst erfolgter Etablierung und Optimie-



▲ **Abb. 1:** *Single-target* ddPCR-Assays für *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen **A**, Es werden ddPCR Assays für *KRAS* G12V, G12D und G12R gezeigt. Die *locked nucleic acid* (LNA)-basierten Sonden und Primer wurden hausintern entwickelt und alle Assays hinsichtlich der PCR-Bedingungen individuell optimiert. Blau: Tröpfchen positiv für die jeweilige untersuchte *KRAS*-Mutation, Grün: Wildtyp *KRAS*-Tröpfchen, Orange: doppelt positive Tröpfchen, Grau: leere Tröpfchen. **B**, Zellfreie DNA wurde aus dem Plasma von gesunden Probanden und Patienten mit Pankreaskarzinom (resektables Stadium sowie metastasiertes Stadium) extrahiert und mit *KRAS-single-target* ddPCR Assays analysiert. **C**, Allelfrequenz (AF) *KRAS*-positiver zellfreier DNA in Pankreaskarzinompatienten detektiert mit den hausintern entwickelten und etablierten Assays vs. kommerzielle ddPCR-Einzelassays (Bio-Rad®). **D**, Analyse der Kreuzreaktivität von *KRAS* G12V-, G12D-, G12R-Assays durch die Analyse von zellfreier DNA mit anderen *KRAS* G12-Einzelnukleotid-Polymorphismen. Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$. Modifiziert nach Hussung *et al.* [12].

rung mit rekombinanter DNA wurden die *single-target* Assays mit cfDNA-Proben, extrahiert aus dem Plasma von Pankreaskarzinompatienten, validiert [12]. Das Pankreaskarzinom wurde hierbei aufgrund seiner *KRAS*-Mutationsprävalenz von ca. 95 Prozent als Entität ausgewählt. Es zeigte sich eine ausgezeichnete Trennung zwischen cfDNA-positiven Pankreaskarzinompatienten verschiedener Tumorstadien und der cfDNA, die aus dem Plasma gesunder Probanden extrahiert wurde (**Abb. 1B**). Insgesamt konnte in elf von 23 Patienten (47,8 %) mit resektablem Pankreaskarzinom und in 34 von 49 Patienten (70,8 %) mit bereits metastasiertem Pankreaskarzinom zirkulierende Tumor-DNA im Plasma detektiert werden. Ein Vergleich der Allelfrequenzen der einzelnen *KRAS*-SNVs in

Patientenproben, welche mittels der hausintern entwickelten *single-target* Assays und kommerziell erhältlichen Assays (Bio-Rad®) analysiert wurden, zeigte eine durchweg hohe Konkordanz (**Abb. 1C**, [12]).

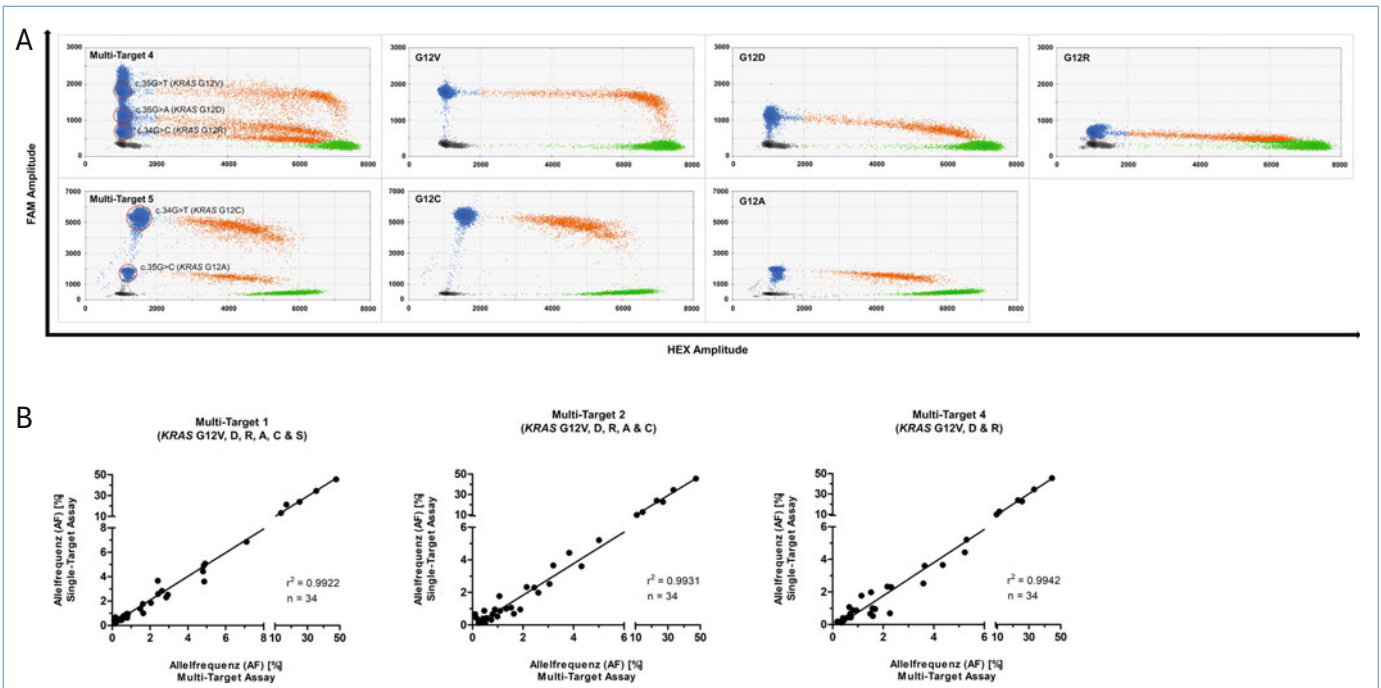
Abbildung 1D verdeutlicht die insgesamt geringe Kreuzreaktivität zwischen den jeweiligen Assays. Diese wurde untersucht, indem Proben, die positiv für *KRAS* G12V, D, oder R sind, mit *KRAS* G12V-, D-, R-, A- oder C-*single-target* Assays analysiert wurden. Zusammenfassend gelang uns somit die Entwicklung und Optimierung von Hot-Spot-*KRAS*- und -*NRAS* ddPCR Assays mit Assayleistungen, die denen kommerzieller Assays nicht unterlegen sind, und deren Verwendung für Patientenproben erfolgreich validiert werden konnten [12].

Etablierung von diskriminatorischen *KRAS/ NRAS-multi-target* ddPCR Assays zum Screening zellfreier DNA

Die Kombination mehrerer individuell optimierter Sonden mit unterschiedlichen intrinsischen Eigenschaften und Konzentrationen in einem einzigen Assay ermöglicht die Entwicklung von diskriminierenden *multi-target* ddPCR Assays. Zwei bis sechs mutationsspezifische Sonden wurden zusammen mit einer entsprechenden Wildtypsonde kombiniert, um *multi-target* Assays zu etablieren [12]. Die SNVs wurden hierbei auf der Grundlage ähnlicher Assaybedingungen ausgewählt, mit dem Ziel, eine größtmögliche Trennung der individuellen Tröpfchen-Cluster in der 2D-Ansicht zu erhalten und gleichzeitig lediglich minimale Kompromisse hinsicht-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** Multi-target ddPCR Assays für KRAS- und NRAS-Mutationen **A**, Verschiedene Sonden für die mutierte KRAS-Sequenz wurden zu multi-target Assays kombiniert, mit dem Ziel eine maximale Trennung der Tröpfchen-Cluster in der 2D-Ansicht zu erreichen. Es werden zwei verschiedene multi-target Assays gezeigt. Blau: Tröpfchen positiv für die jeweilige KRAS-Mutation, Grün: Wildtyp KRAS-Tröpfchen, Orange: doppelt positive Tröpfchen, Grau: leere Tröpfchen. **B**, cfDNA-Proben von Pankreaskarzinompatienten wurden mit den single- und multi-target Assays analysiert und die jeweiligen detektierten Allelfrequenzen gegeneinander aufgetragen, n = 34. Modifiziert nach Hussung *et al.* [12].

lich der Sensitivität und Spezifität der resultierenden Screening Assays einzugehen. Die LODs und LOBs wurden analog zu den single-target-Assays bestimmt und es wurden Sensitivitäten zwischen 0,022 und 0,16 Prozent Allelfrequenz erreicht [12]. Insgesamt resultierten sieben verschiedene multi-target Assays, die jeweils zwei bis sechs SNVs abdecken (**Abb. 2A**). Da sich die Tröpfchen-Cluster der einzelnen KRAS-SNVs hierbei auf unterschiedlicher Amplitudenhöhe anordnen, kann trotz Multiplex-Ansatz auf den

vorliegenden KRAS-Subtyp rückgeschlossen werden [12]. Aufgrund des Vorhandenseins mehrerer Sonden in einem einzigen Assay sind die Sensitivitäten und Spezifitäten für die multi-target Assays insgesamt etwas niedriger, liegen aber immer noch in einem für das cfDNA-Screening geeigneten Bereich, insbesondere, da die geringe Ausgangsmenge an DNA und nicht die Assaysensitivität typischerweise den Mutationsnachweis in zellfreier DNA einschränken (**Tab. 1**).

Zur Beurteilung der Inter-Assay-Präzision zwischen den etablierten single- und multi-target Assays, wurden cfDNA-positive Patientenproben parallel analysiert und die detektierten Allelfrequenzen gegeneinander aufgetragen, wobei sich eine ausgezeichnete Korrelation ergab (**Abb. 2B**, [12]).

Screening von Patientenproben auf KRAS- und NRAS-Mutationen

Beim Screening zellfreier DNA von Pankreaskarzinompatienten aller Krankheitsstadien

Tabelle 1: KRAS- und NRAS-ddPCR Assays

Gen	Genotyp	Mutation (SNV) [§]	LOD [% AF] [§]	
single-target Assays	KRAS	G12V	c.35G>T	0,027
		G12D	c.35G>A	0,045
		G12R	c.34G>C	0,041
		G12A	c.35G>C	0,012
		G12C	c.34G>T	0,017
		G12S	c.34G>A	0,036
	NRAS	G13D	c.38G>A	0,032
		Q61H	c.183A>C	0,011
		Q61L	c.182A>T	0,069
		Q61R	c.182A>G	0,018
		Q61K	c.181C>A	0,018
multi-target Assays	KRAS	Multi-Target 1	G12V, G12D, G12R, G12A, G12C, G12S	0,16
		Multi-Target 2	G12V, G12D, G12R, G12A, G12C	0,11
		Multi-Target 3	Q61H, Q61L, Q61R, Q61K	0,038
		Multi-Target 4	G12V, G12D, G12R	0,11
	NRAS	Multi-Target 5	G12A, G12C	0,053
		Multi-Target 6	G12S, G13D	0,095
		Multi-Target 7	Q61L, Q61R, Q61K	0,022

[§]AF: Allelfrequenz; [§]SNV: Einzelnukleotidpolymorphismus

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

mit bisher unbekanntem *KRAS*-Mutationsstatus auf das Vorliegen einer *KRAS*-Mutation konnten wir in insgesamt 45/71 Fällen (11/23 (47,8 %) chirurgisch resektablen Tumoren, 34/48 (70,8 %) metastasierte Pankreaskarzinompatienten) *KRAS* im Plasma nachweisen [12]. Die Prävalenz von *KRAS* in zellfreier DNA innerhalb unserer Patientenkohorte korreliert gut mit publizierten Daten, wobei in weniger als 50 Prozent der frühen Tumorstadien und in etwa 70 Prozent der bereits fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinompatienten zirkulierende Tumor-DNA im Plasma detektiert werden kann [5, 6]. Für eine Untergruppe unserer Patientenkohorte wurde während des weiteren Krankheitsverlaufs eine *KRAS*-Gewebe-mutationsanalyse verfügbar, die durch zerti-fizierte molekularpathologische Routine-untersuchungen (*next generation sequencing*, NGS) durchgeführt wurde, wobei sich eine hundertprozentige Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen zeigte [12].

In sämtlichen untersuchten Patientenproben mit Nachweis einer *KRAS*- oder *NRAS*-Mutation im Screening Assay ließ sich die gefundene Mutation im hochspezifischen Einzelassay bestätigen (45/45 ctDNA-positive Fälle, 100 % Konkordanz) [12].

Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten, dass es möglich ist, für ein Zweifarben-ddPCR-System, wie das QX100/200 ddPCR Systems von Bio-Rad®, hochsensitive und spezifische *multi-target* Assays zu etablieren und damit mit hoher Sicherheit bis zu sechs Mutationen gleichzeitig zu detektieren, identifizieren und quantifizieren. Wesentliche Voraussetzung hierfür war die Etablierung eigener mutationsspezifischer Einzelassays, was die für den Multiplexprozess nötige Flexibilität und Versatilität mit sich brachte. Multiplex-ddPCR-Systeme stellen aus unserer Sicht eine kostengünstige und sehr robuste Alternative zu NGS-basierten Methoden in der Mutationsdetektion aus

cfDNA dar, wenn nach einer Reihe bekannter Hot-Spot-Mutationen gleichzeitig gescreent werden soll. Das beschriebene Assaysystem hat in unseren Augen viel Potenzial für Forschung und klinische Routine und ist für Forschungs- und Diagnoseeinrichtungen einfach zu etablieren. Die detaillierte Methodik wurde von uns kürzlich publiziert [12]. ■

Literatur

- [1] Alix-Panabières C, Pantel K (2016) Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* 6:479–491
- [2] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ et al. (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra224
- [3] Diaz LA Jr., Bardelli A (2014) Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32:579–586
- [4] Macías M, Alegre E, Díaz-Lagares A et al. (2018) Liquid biopsy: from basic research to clinical practice. *Adv Clin Chem* 83:73–119
- [5] Cohen JD, Javed AA, Thoburn C et al. (2017) Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:10202–10207
- [6] Cohen JD, Li L, Wang Y et al. (2018) Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 359:926–930
- [7] Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. (2016) Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 8:346ra392–346ra392
- [8] Yamada T, Matsuda A, Koizumi M et al. (2019) Liquid biopsy for the management of patients with colorectal cancer. *Digestion* 99:39–45

- [9] Baker M (2012) Digital PCR hits its stride. *Nat Meth* 9:541–544
- [10] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA et al. (2013) Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Meth* 10:1003–1005.
- [11] Janku F, Huang HJ, Fujii T, et al. (2017) Multiplex KRASG12/G13 mutation testing of unamplified cell-free DNA from the plasma of patients with advanced cancers using droplet digital polymerase chain reaction. *Ann Oncol* 28:642–650
- [12] Hussung S, Follo M, Klar RFU et al. (2020) Development and Clinical Validation of Discriminatory Multitarget Digital Droplet PCR Assays for the Detection of Hot Spot KRAS and NRAS Mutations in Cell-Free DNA. *TJ Mol Diagn* 22:943–956
- [13] Armbruster DA, Pry T (2008) Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 29 (Suppl 1):S49–S52

Funding Open Access funding provided by University of Zurich.

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:

Dr. Ralph M. Fritsch
UniversitätsSpital Zürich
Klinik für Innere Medizin I
Klinik für Medizinische Onkologie und
Hämatologie
Raemistraße 100
CH-8091 Zürich
ralph.fritsch@usz.ch

AUTOREN



Saskia Hussung

2012–2019 Medizinstudium an der Universität Freiburg. Seit 2015 Forschungstätigkeit Universitätsklinik Freiburg Labor Dr. Fritsch. 2017 Forschungsstipendiatin GMIHO-DGHO. Doktorandin an der Universität Freiburg. Seit 2020 Assistenzärztin Klinik für Medizinische Onkologie und Hämatologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz



Ralph Fritsch

1993–2000 Medizinstudium an der Universität Regensburg und TU München. 2002 Promotion TU München. 2008 Facharzt Innere Medizin. 2008–2014 Research Fellow Cancer Research UK London Research Institute. Seit 2014 Forschungsgruppenleiter Universitätsklinik Freiburg. 2016 Facharzt Hämatologie und Medizinische Onkologie. Seit 2019 Abteilungsleiter Medizinische Gastrointestinale Onkologie und Forschungsgruppenleiter Universitätsspital Zürich, Schweiz.