

Proteomik och genomik för nya möjligheter inom cancerdiagnostik

Ett nytt sätt att identifiera cancerbiomarkörer har utvecklats av forskare vid Lunds universitet. Den nya tekniken möjliggör mycket känslig, snabb och kostnadseffektiv identifiering av biomarkörer för cancer. Detta skapar nya möjligheter för tidigare diagnos av cancer och därmed också effektivare behandling. Forskningen, som här beskrivs av **Mattias Brofelth** och **Carl Borrebaeck**, har publicerats i *Nature Communication Biology*.

Anlays av blodets dynamiska uppsättning av proteiner är en utmanande uppgift till följd av blodproteomets enorma komplexitet. Samtidigt är blodproteomet en rik källa av information som till stor del är outforskad i jakten på relevanta biomarkörer (Borrebaeck, 2017). Genom att exempelvis studera skillnader i uttryck av olika proteiner som är kopplade till immunförsvaret är det möjligt att tidigt detektera respons på förändringar i kroppen till följd av en begynnande sjukdom så som en växande tumör. Att dessutom kombinera informationen från ett flertal proteiner i en så kallad multiplex biomarkörsignatur ökar möjligheten att hitta ett unikt ”fingeravtryck” för en specifik sjukdom, jämfört med att mäta enskilda biomarkörer. Blodbaserade biomarkörsignaturer har stor potential att kunna ge vägledning vid screening, diagnos, prognos, monitorering eller behandling av tumörsjukdomar.

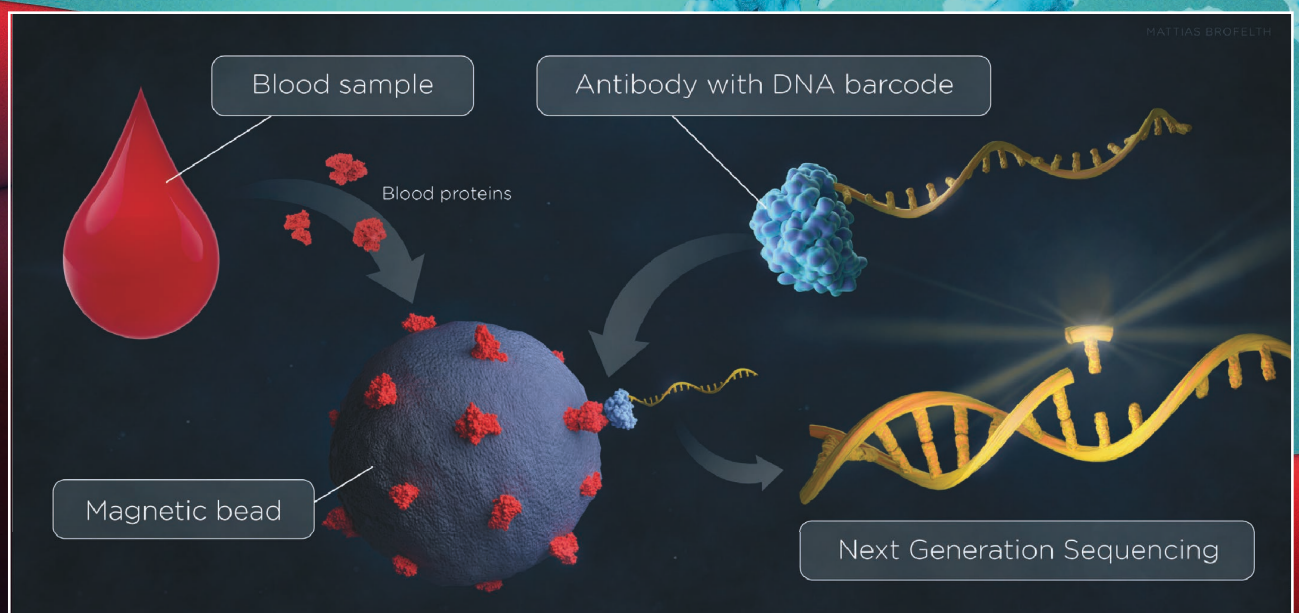
För att övervinna blodproteomets utmaningar krävs tekniska innovationer i kombination med avancerad

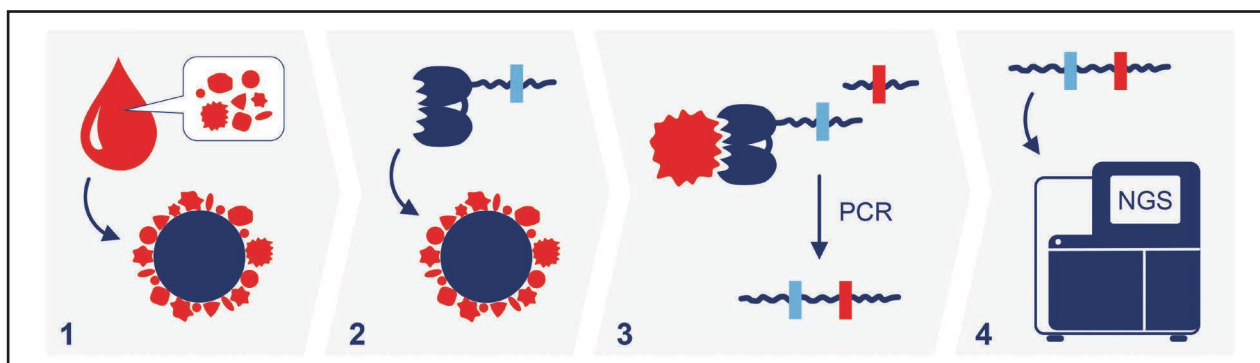
bioinformatik. Affinitetsproteomik är en teknik som med framgång har använts för denna uppgift. Ett exempel är mikroarrayer på chip (biomatriser) som baseras på antikroppars förmåga att ur det komplexa blodprovet fiska fram sitt specifika protein och ge en signal i proportion till dess koncentration (Haab, 2001) (Schröder, 2013). Vi har tidigare visat att biomarkörsignaturer går att identifiera i ett blodprov för sjukdomar såsom bland annat cancer i pankreas (Mellby, 2018), bröst (Carlsson, 2008) samt i olika autoimmuna sjukdomar (Delfani, 2017).

SYNERGI MELLAN FORSKNINGSFÄLT

Dessa teknologiska framsteg har banat väg för en fortsatt utveckling och vi publicerade nyligen en konceptstudie för nästa generations teknikplattform, kallad ProMIS – Protein detection using Multiplex Immunoassay in Solution (Brofelth, M., Ekstrand, A.I., 2020). Konceptet bygger på att kombinera antikropparnas målsökande egenskaper med genomikens förmåga för

i samklang öppnar





Figur 1 – Principen för ProMIS. I Steg 1 blandas en droppe blod med kulor där blodproteiner fastnar genom en biotin/streptavidin-koppling; I Steg 2 tillsätts antikroppar märkta med en specifik DNA-etikett till kulorna; I Steg 3 utrustas DNA-etiketten med ett provspecifikt index och amplifieras med hjälp av PCR; I Steg 4 avkodas DNA-etiketten med NGS.

ultrakänslig detektion med hjälp av NGS (Next Generation Sequencing) (Figur 1). Denna synergi mellan forskningsfältet uppnås genom att koppla en unik DNA-etikett till varje antikropp. Syntetiskt DNA kan idag rutinmässigt produceras efter önskemål och vi designade våra etiketter som en kort sekvens av nukleotider, specifik för varje antikropp. Detta ger oss möjligheten att ”läsa av” och kvantifiera DNA-etiketten med NGS vilket resulterar i att vi kan mäta vilket målprotein (biomarkör) som antikroppen har bundit. Analysen av blodprovet kan då göras helt i lösning genom att först märka alla proteiner i blodprovet med biotin och sedan binda upp dem till magnetiska kulor (beads) med hjälp av streptavidin. Kulorna kan separeras och tvättas med hjälp av en magnet, vilket också möjliggör en framtida övergång till en helt automatiserad process baserat på robotisering.

DESIGNAR OM ANTIKROPPAR

För att demonstrera konceptet använde vi ProMIS för att analysera serumprov från cancerpatienter med pankreascancer (PDAC) och jämförde dessa med friska individer. 17 antikroppar valdes utifrån att de tidigare visat förmåga att särskilja grupperna i publicerade (Mellby, 2018) och opublicerade studier med hjälp av biomatriser. Antikropparna designades om för att kunna utrustas med varsin DNA-etikett. En mikroliter var av de biotinylerade blodproven blandades med de magnetiska kulorna. Proteiner som inte bundit till kulorna tvättades bort med hjälp av en magnet och därefter tillsattes en mix av alla antikropparna till varje rör för att binda till sina respektive målprotein. Efter en ny tvätt användes PCR för att fästa NGS-adaptorer och ett provspecifikt index till antikropparnas DNA-etikett. Genom att ändra antalet PCR-cykler går det också att styra DNA-amp-

Genom att utföra analysen i lösning undviker vi också den mer krävande logistiken med att producera biomatriser, till exempel lokalisation av antikroppar med hög precision, variationer och fysiska begränsningar av biomatrisens ytor.

ProMIS koncept undviker flera inneboende begränsningar med dagens biomatriser, vilket resulterar i en snabbare, känsligare och robustare testprincip. Genom att utföra analysen i lösning undviker vi också den mer krävande logistiken med att producera biomatriser, till exempel lokalisation av antikroppar med hög precision, variationer och fysiska begränsningar av biomatrisens ytor. Metoden blir därigenom mer flexibel och det går att använda standardiserade 96-hålsplattor för att skala upp och effektivisera analysen av ett stort antal prov med mindre behov av operatörer. Principen att läsa av signalen via DNA gör det också enklare att amplifiera signalen, vilket tillsammans med kapaciteten och känsligheten i NGS möjliggör analys i ett större dynamiskt område och detektion av biomarkörer med mycket låg koncentration.

lifieringen. Eftersom DNA-etiketterna till de antikroppar som tillhör varje prov nu har ett provspecifikt index kan alla olika prov blandas för att parallellt sekvenseras med NGS med hjälp av en Illumina NextSeq 500. Efter sekvenseringen analyserades resultatet med hjälp av så kallad unsupervised PCA (principal component analysis) och maskininlärning för att studera hur väl PDAC-proven kunde separeras från kontrollerna. Maskininlärningen var av typen Support Vector Machine (SVM) med leave-one-out (LOO) korsvalidering, som genererar en ROC-kurva (receiver operating characteristic) där AUC-värdet (arean under ROC-kurvan) anger hur väl grupperna kan klassificeras.

Serumproven delades upp i tre separata försök. I det första försöket analyserades 20 prov varav 10 PDAC stadium IV och 10 kontroller. DNA-etiketterna för alla antikroppar


VÅRA LUNGOR

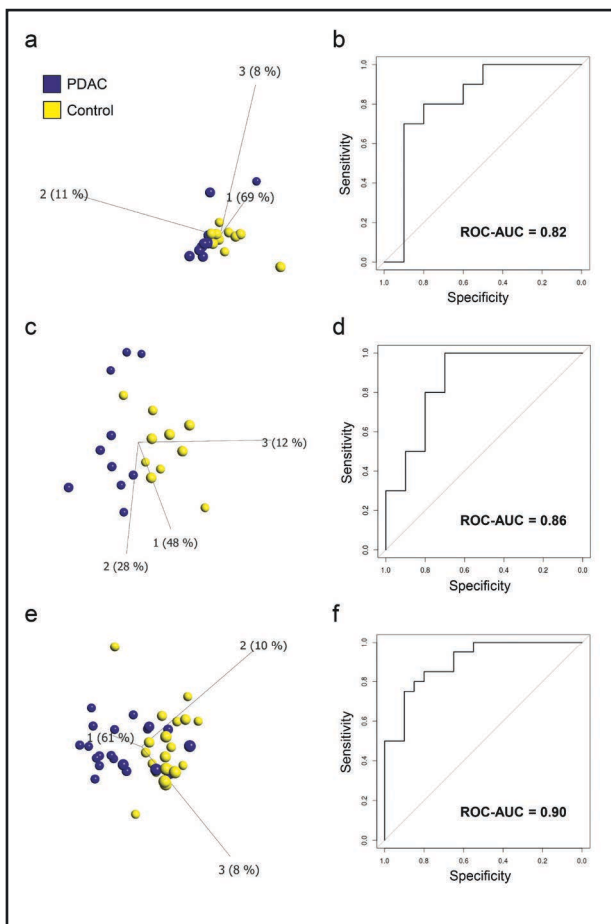
Det handlar om överlevnad –
tillsammans kan vi rädda liv.

Varje år får cirka 4000 svenskar beskedet att de har lungcancer.¹ Prognosen för överlevnad har förbättrats de senaste tio åren men trots det är lungcancer fortfarande den cancerform som flest dör av.² 5-årsöverlevnaden på 17 procent för män och 24 procent för kvinnor är långt ifrån tillfredsställande.³ Tillsammans kan vi genom forskning och utveckling förändra situationen.

– Tillsammans kan vi rädda liv.

Referens 1-3: Cancer i siffror 2018, Socialstyrelsen och Cancerfonden.

AstraZeneca 
www.astrazenecaconnect.se



Figur 2 – Resultat från tre oberoende försök med totalt 80 serumprov. Analysen gjordes med unsupervised PCA (principal component analysis) och supervised klassificering med SVM (support vector machine). a-b: Försök 1 med 10 PDAC stadium IV och 10 kontroller; c-d: Försök 2 med 10 PDAC stadium IV och 10 kontroller; e-f: Försök 3 med 10 PDAC stadium IV, 10 PDAC stadium III och 20 kontroller.

i alla prov kunde framgångsrikt hittas vid analys av sekvenserna från NGS vilket demonstrerade proof-of-concept för metoden. Dessutom grupperade proverna efter sjukdomsstatus i PCA (Figur 2a) och gav ett ROC-AUC-värde på 0.82 med SVM (Figur 2b). Försöket upprepades med 20 nya oberoende prov och ett liknande resultat erhöles med PCA (Figur 2c) och ROC-AUC på 0.86 (Figur 2d). Det tredje försöket gjordes med ytterligare 40 nya serumprov varav 20 PDAC (10 stadium IV och 10 stadium III) och 20 kontroller. Återigen kunde DNA från alla antikroppar hittas och separeras på PCA (Figur 2e) och klassificeras med ROC-AUC på 0.90 (Figur 2f).

Med dessa konceptuella försök har vi demonstrerat hur ProMIS kan användas för att studera uttrycket av olika biomarkörer i blodprov. Panelen av 17 antikroppar, utvalda med biomatrisanalys för sin förmåga att kunna särskilja PDAC-prov från kontroller, fungerade väl i ProMIS-metoden för att särskilja cancerprover från kontroller med hög noggrannhet. Multiplexiteten kan enkelt skalas upp eftersom rekombinanta antikroppsfragment kan selekteras mot de flesta målprotein med hjälp av fag-display. Dessa kan sedan utrustas med DNA-etiketter, vilka kan genereras i ett enormt antal unika kombinationer. Den snabba utvecklingen som idag sker inom genomiken och sekvensering gör också att kapaciteten för ProMIS snabbt växer, vilket ökar förmågan att generera kliniskt värdefull information om sjukdomsassocierade förändringar som i slutändan kommer gynna både patienter och samhälle.

<https://www.nature.com/articles/s42003-020-1068-0>

REFERENSER

Borrebaeck, C. (2017). Precision diagnostics: moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17, 199–204.

Brofelth, M., Ekstrand, A.I. (2020). Multiplex profiling of serum proteins in solution using barcoded antibody fragments and next generation sequencing. *Communications Biology*, 3, 339.

Carlsson, A. (2008). Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays. *European Journal of Cancer*, 44, 472–480.

Delfani, P. (2017). Deciphering systemic lupus erythematosus-associated serum biomarkers reflecting apoptosis and disease activity. *Lupus*, 26, 373–387.

Haab, B. (2001). Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome biology*, 2, RESEARCH0004.

Mellby, L. (2018). Serum Biomarker Signature-Based Liquid Biopsy for Diagnosis of Early-Stage Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 36, 2887–2894.

Schröder, C. (2013). Plasma protein analysis of patients with different B-cell lymphomas using high-content antibody microarrays. *Proteomics Clinical Applications*, 7, 802–812.

MATTIAS BROFELTH, PHD, CREATE HEALTH TRANSLATIONAL CANCER CENTER OCH INSTITUTIONEN FÖR IMMUNTEKNOLOGI, LUNDS UNIVERSITET, MATTIAS.BROFELTH@IMMUN.LTH.SE



CARL BORREBAECK, PROFESSOR, CREATE HEALTH TRANSLATIONAL CANCER CENTER OCH INSTITUTIONEN FÖR IMMUNTEKNOLOGI, LUNDS UNIVERSITET, CARL.BORREBAECK@IMMUN.LTH.SE

