

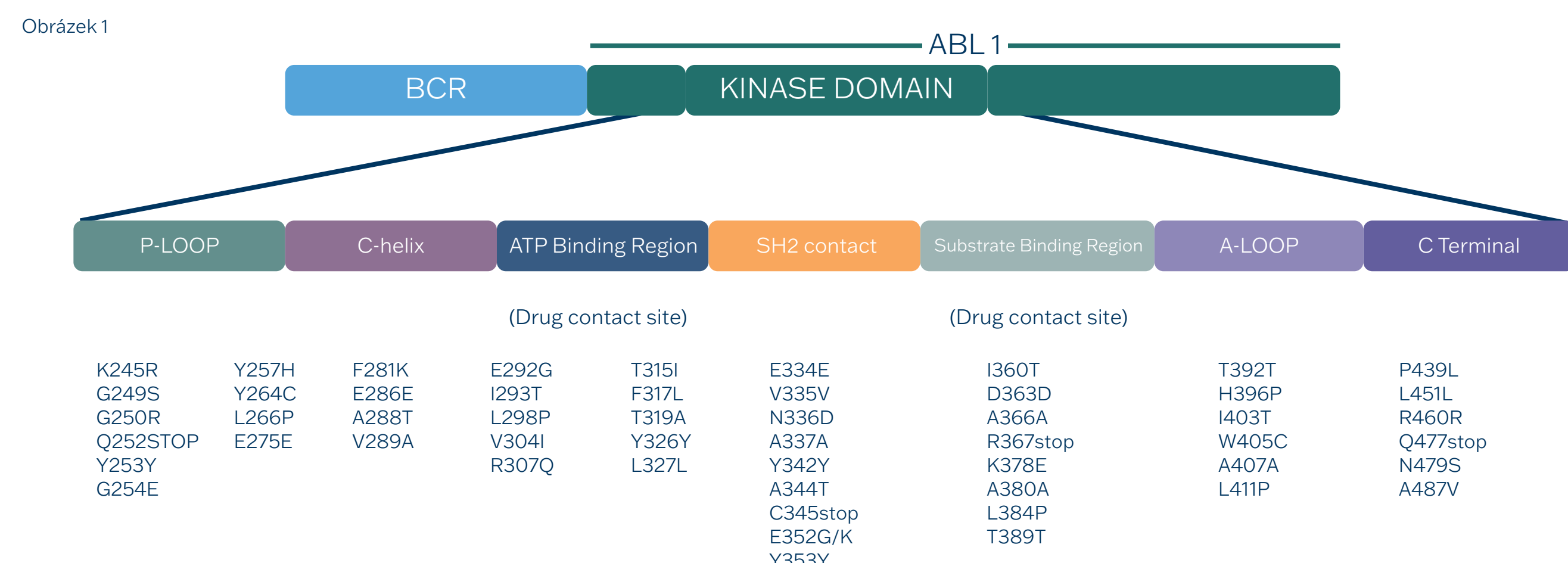
fastGEN – nová NGS metoda pro detekci mutací v kinázové doméně fúzního genu *BCR::ABL1*

¹Onderková M., ^{1,2}Zermeghová D., ¹Vojtíšek J., ¹Dvořáková B., ¹Kosztyu P., ¹Chladová V., ¹Bezděková K., ³Brož P., ²Slavkovský R.

¹BioVendor – Laboratorní medicína a.s., Brno, ²Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, ³Bioxsys s.r.o.

Úvod

Vyšetření mutačního statusu v kinázové doméně (KD) fúzního genu *BCR::ABL1* je v době užívání inhibitorů tyrozin kináz (TKI) klíčovou součástí léčebného protokolu u nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML). V současnosti je standardní metodou pro analýzu mutací Sangerovo sekvenování, které má však omezenou citlivost. Alternativní metodou k detekci mutací v KD může být sekvenování nové generace (NGS).



Převzato: https://www.researchgate.net/figure/Distribution-of-the-mutations-with-respect-to-the-main-regions-of-the-Bcr-abl-kinase_fig1_269519341

Cílem této práce bylo vyvinout vysoce citlivý protokol pro určení mutačního statusu fúzního genu *BCR::ABL1* metodou fastGEN a to tak, aby bylo dosaženo detekce mutací 5 % (VAF) u vzorků s velmi nízkým počtem kopií fúzního genu ($\geq 0,1$ % IS).

K úspěšné genotypizaci transkriptu fúzního genu *BCR::ABL1* je potřeba nejprve provést reverzní transkripci do cDNA a pro záchyt i nízkého počtu kopií následnou preamplifikaci. Pro preamplifikační reakci byly navrženy primerové páry cílící na dva typy transkriptů genu *BCR::ABL1* – major zlomu a minor zlomu. Tato preamplifikační reakce zajistí dostatečné množství kopií fúzního genu pro následnou fastGEN reakci a dosažení vyšší citlivosti soupravy.

Metodika

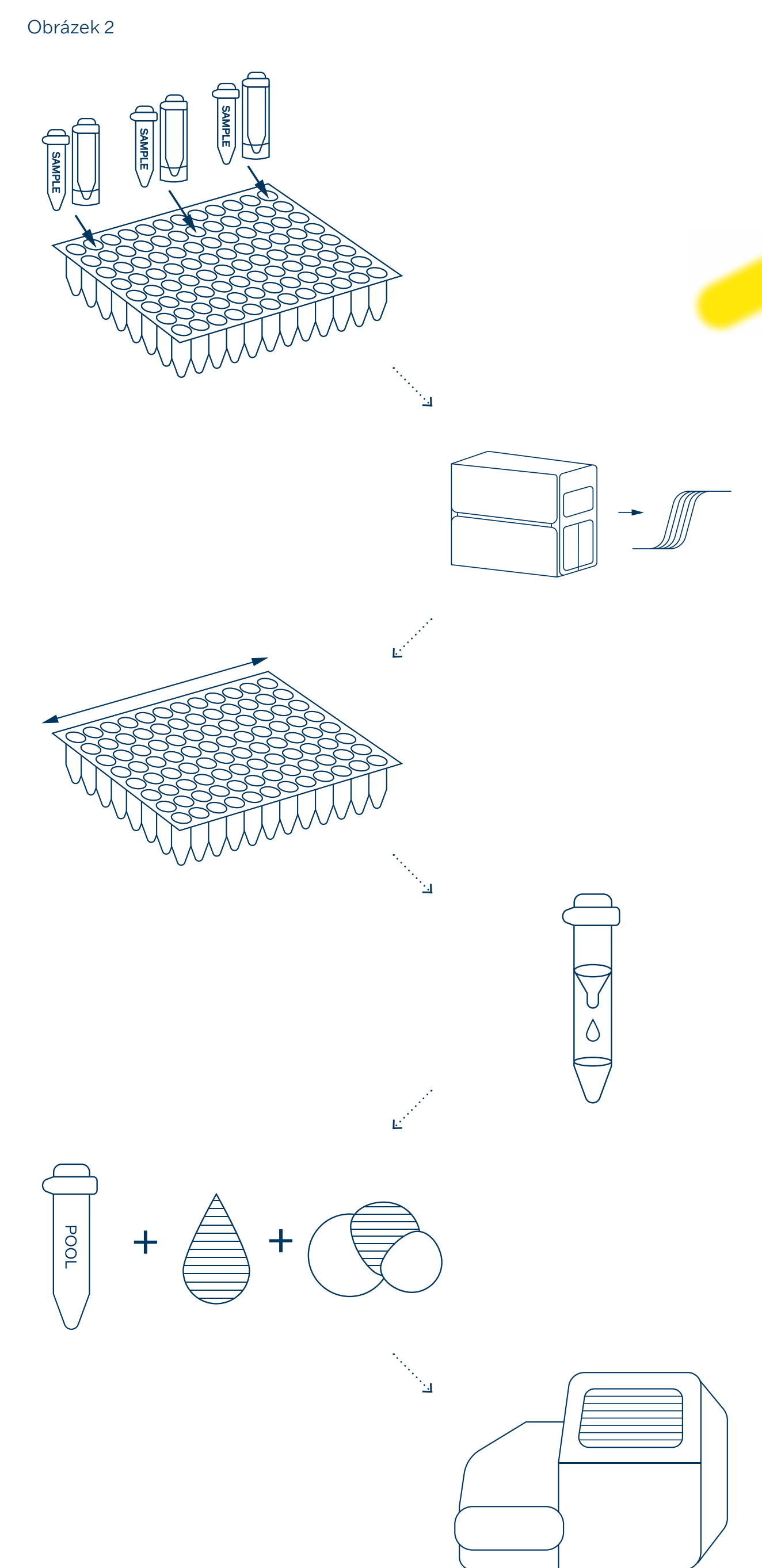
Vzorky: Metoda byla optimalizována na DNA synteticky připravených kontrolách a RNA z buněčných kultur K562 a HCT116. A poté validována na klinických vzorcích.

Příprava knihovny NGS: Technologie fastGEN, NGS metoda založená na polymerázové řetězové reakci se speciálně navrženými tagovanými hybridními primery. Princip stanovení využívá krátkých amplikonů o délce až 287 bp a následného sekvenování o vysokém pokrytí (Obrázek 2).

FastGEN *BCR::ABL1* cílí na oblast exonů 4 až 10, což je ATP vazebné místo v KD. Reverzní transkripcie byla provedena enzymem SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen™). Pro preamplifikační qPCR reakci byl použit ready-to-use Master mix (pro analýzu major zlomu nebo minor zlomu). Produkt preamplifikační reakce byl následně přidán do konkrétního Master mixu pro fastGEN. Po fastGEN qPCR analýze byly vzorky spoolovány, přečištěny a sekvenovány. Pro navýšení specifity byly použity custom sekvenční primery.

Sekvenování: Illumina MiSeq s použitím paired-end read 2 x 150 bp.

Vyhodnocení: K analýze sekvenačních dat byl použit software GENOVESA, který je součástí komplexního řešení fastGEN.



Výsledky

Pro dosažení vyšší citlivosti soupravy bylo nutné provést optimalizaci preamplifikační reakce, kdy došlo k navýšení reakčního objemu až na 50 μ l za současného navýšení vstupního objemu cDNA (z 1,5 μ l na 5 μ l cDNA). Navýšení objemu preamplifikační reakce pozitivně korelovalo s očekávanými výslednými hodnotami VAF (Tabulka 1). Souhrnná data optimalizačního experimentu jsou uvedena v Tabulce 2. Diagnostická senzitivita a specifita byla stanovena na klinických vzorcích (Tabulka 3).

Tabulka 2

VAF	11,7	RT			Preamplifikace		
		objem rxn	objem vzorku	počet kopií <i>BCR::ABL1</i>	objem rxn	objem vzorku	počet kopií <i>BCR::ABL1</i>
% IS	23,9						
Varianta 1		50	25	575000	50	5	57500
Varianta 2		20	10	230000	50	5	57500
Varianta 3		50	12,5	287500	50	5	28750
Varianta 4		50	12,5	287500	70	5	28750
Varianta 5		20	10	230000	30	3	34500
Varianta 6		50	25	575000	30	3	34500
Varianta 7		50	25	575000	20	2	23000

Tabulka 3

Ověření klinické funkce	
Správná pozitivita	13
Falešná pozitivita	0
Správná negativita	10
Falešná negativita	0
Diagnostická senzitivita	100%
Diagnostická specifita	100%

Tabulka 1

ID vzorku	Charakterizace vzorku		očekávaný výsledek	Výsledky původní nastavení		Výsledky nové nastavení	
	% IS	počet kopií v 1 μ l cDNA		mutace	% VAF	mutace	% VAF
MD012/23	3	300	F311L 15 %	F311L	no variants	F311L	20,23%
MD001/24	1	105	E453V 11 %	E453V	no variants	E453V	11,00%
MD003/24	0,4	76	F317L 10 %	F317L	no variants	F317L	5,77%

VAF	11,7	Dičí výsledky qPCR				Výsledky sekvenace		
		Preamplifikace		fastGEN CT hodnoty		% VAF		hloubka čtení
% IS	23,9	CT	MeltPeak	MM A	MM B	E255K	G250E	
Varianta 1		29,81	86,5	2,16	2,63	25,5	24,3	36336
Varianta 2		31,26	86,5	3,13	3,9	44,15	42,33	37293
Varianta 3		31,5	87	2,31	2,79	40,15	38,61	31735
Varianta 4		32,75	86,5	2,49	3,12	35,48	34,88	36103
Varianta 5		35,3	86	3,13	3,9	70,3	68,71	28559
Varianta 6		38,79	None	3,65	7,14	nesequenováno		
Varianta 7		38,94	None	4,13	11,76	3,93	3,95	33485

Závěr

Úspěšné genotypizace transkriptu fúzního genu *BCR::ABL1* ve vzorcích s nízkou hodnotou IS ($\geq 0,1$ % IS) a VAF ≥ 5 % bylo docíleno optimalizací preamplifikační reakce, která zajistila dostatečné množství kopií fúzního genu vstupujícího do fastGEN reakce a tím dosažení vyšší citlivosti soupravy.

FastGEN je NGS technologie založená na použití krátkých amplikonů, což zvyšuje amplifikovatelnost DNA a diagnostickou výtěžnost. Master Mixy dodávané ve formátu k přímému použití umožňují úsporu celkového času na vyšetření a snížení rizika chyby.

Prokázali jsme, že fastGEN *BCR::ABL1* by mohl být vhodnou metodou pro rutinní diagnostiku a zlepšit kvalitu získaných výsledků.

Reference:
Zhou, T., Medeiros, L.J. & Hu, S. Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Curr Hematol Malig Rep* 13, 435–445 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>.
Braun, T. P., Eide Ch. A., Druker, B. J., Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell* 37, 530–542 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.006>.