

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Digitální PCR jako nástroj pro sledování reziduální
nemoci na základě detekce molekulárních markerů
asociovaných s patogenezí vybraných
hematologických chorob**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Lucie Fryštáková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Beáta Katrincsáková, Ph.D.
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury pod odborným vedením Mgr. Beáty Katrincsákové, PhD. na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci.

V Olomouci dne 8.8.2022

.....

Chtěla bych velmi poděkovat své vedoucí Mgr. Beátě Katrincsákové, PhD. za odborné vedení této práce, za pomoc a všechen čas strávený při její realizaci. Zároveň děkuji i kolektivu pracovníků Laboratoře molekulární biologie HOK FN a LF UP v Olomouci, především Mgr. Janě Navrátilové za poskytnutá data. Své rodině děkuji za podporu během celého studia.

Tato práce byla podpořena grantem MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Fryštáková
Název práce	Digitální PCR jako nástroj pro sledování reziduální nemoci na základě detekce molekulárních markerů asociovaných s patogenezi vybraných hematologických chorob
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Beáta Katrincsáková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá analýzou bodových mutací, které doprovázejí patogenezí vybraných hematologických onemocnění a slouží jako diagnostické markery u systemové mastocytózy (mutace D816V genu <i>c-KIT</i>) a vlasatobuněčné leukemie (mutace V600E genu <i>BRAF</i>) a/nebo představují slibné terapeutické cíle a potenciální markery reziduální nemoci (mutace genů <i>IDH1/IDH2</i> u akutních myeloidních leukemií). Digitální PCR představuje časově a finančně nenáročnou molekulární techniku, která umožňuje při nízkém nároku na vstupní genetický materiál spolehlivě detekovat vybrané genové mutace i při jejich nízké alelické frekvenci. Experimentální část této práce byla provedena na 2 různých platformách dPCR, na systému Naica® (Stilla Technologies) a na QIAcuity (Qiagen). V práci byly shrnuty výsledky získané na základě detekce mutací <i>IDH1/IDH2</i> a <i>BRAF</i> pomocí komerčně dostupných kitů (ID Solutions). Druhá část výsledků byla získána během optimalizace vlastních metod detekce vybraných mutací genů <i>c-KIT</i> a <i>BRAF</i> pomocí digitální PCR na systému QIAcuity. Určení bodových mutací pomocí digitální PCR vhodně doplní dostupné techniky analýzy bodových mutací založené na alelově specifické PCR amplifikaci a sekvenování. Výsledky této práce přispějí k zpřesnění analýzy bodových mutací <i>c-KIT</i>^{D816V} a <i>BRAF</i>^{V600E} v Laboratoři molekulární biologie HOK FNOL.</p>
Klíčová slova	digitální PCR, bodové mutace, <i>BRAF</i> V600E, <i>c-KIT</i> D816V, vlasatobuněčná leukemie, systémová mastocytóza
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Lucie Fryštáková
Title	Digital PCR (dPCR): A tool for monitoring residual disease based on the detection of molecular markers associated with the pathogenesis of selected haematological diseases
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Molecular Biology, Department of Hematooncology, University Hospital Olomouc
Supervisor	Mgr. Beáta Katrincsáková, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>This diploma thesis focuses on the analysis of point mutations that associate with the pathogenesis of selected haematological disorders and serve as diagnostic markers in systemic mastocytosis (D816V mutation of <i>c-KIT</i> gene) and hairy cell leukemia (V600E mutation of <i>BRAF</i> gene) and/or represent promising therapeutic targets and potential markers of residual disease (IDH1/IDH2 gene mutations in acute myeloid leukemias). Digital PCR is a time- and cost-efficient molecular technique that enables reliable detection of selected gene mutations even at low allelic burden with low input genetic material requirements. The experimental part of this work was performed on 2 different dPCR platforms, the naica® system (Stilla technologies) and the QIAcuity system (Qiagen). The summarized results were obtained during the detection of <i>IDH1/IDH2</i> and <i>BRAF</i> mutations using commercially available kits (ID solutions). The second part of the results was gained during the optimization of in-house methods for the detection of selected <i>c-KIT</i> and <i>BRAF</i> gene mutations using digital PCR on the QIAcuity system. Identification of point mutations by digital PCR will suitably complement available point mutation analysis techniques based on allele-specific PCR amplification and sequencing. The results of this work will contribute to the refinement of the analysis of point mutations <i>c-KIT</i> D816V and <i>BRAF</i> V600E point mutations in the Laboratory of Molecular Biology at the University Hospital Olomouc.</p>
Keywords	digital PCR, point mutations, <i>BRAF</i> V600E, <i>c-KIT</i> D816V, hairy cell leukemia, systemic mastocytosis
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	3
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	4
3.1.	Krvetvorba a základní principy vzniku hematologických onemocnění	4
3.2.	Digitální PCR.....	6
3.2.1.	Princip digitální PCR	6
3.2.2.	Platformy digitální PCR.....	8
3.2.2.1.	Naica® krystalová digitální PCR (Stilla Technologies).....	8
3.2.2.2.	QIAcuity digitální PCR systém	9
3.3.	Využití digitální PCR při detekci bodových mutací	10
3.4.	Detekce bodových mutací na bázi alelově specifické amplifikace	10
3.5.	Detekce bodových mutací pomocí sekvenačních technik	11
3.6.	Využití digitální PCR při detekci bodových mutací u vybraných hematologických malignit	12
3.6.1.	Akutní myeloidní leukemie s mutacemi <i>IDH1/IDH2</i>	12
3.6.2.	Aktivační mutace D816V genu <i>c-KIT</i> u systemové mastocytózy	13
3.6.3.	Bodová mutace genu <i>BRAF V600E</i> u vlasatobuněčné leukemie	13
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
4.1.	Soubor pacientů	15
4.2.	Materiál a příslušenství	15
4.2.1.	Přístroje.....	15
4.2.2.	Počítačové softwary a nástroje.....	16
4.2.3.	Spotřební materiál.....	16
4.2.4.	Komerční kity	16
4.2.5.	Roztoky a reagenty.....	17
4.2.6.	Manuály.....	17
4.3.	Digitální PCR.....	18
4.3.1.	Určení koncentrace DNA pomocí fluorimetru Qubit 2.0.....	18
4.3.2.	Komerčně dostupné reakční směsi, oligonukleotidy a sondy pro dPCR	18
4.3.3.	Proces dPCR na platformě Naica® system (Stilla Technologies)	20
4.3.4.	Proces dPCR na platformě QIAcuity Four dPCR systém (QIAgen).....	23
4.4.	Alelově specifická PCR	25
4.5.	Stanovení mutačního profilu genů <i>IDH1</i> (exon 4) a <i>IDH2</i> (exon 4) metodou NGS	28
5	VÝSLEDKY	29
5.1.	Detekce vybraných bodových mutací na platformě "Naica® system" Crystal Digital PCR™ (Stilla Technologies)	29
5.1.1.	Detekce mutací R132X genu <i>IDH1</i> pomocí komerčního kitu IDIDH1-2.....	29
5.1.1.1.	3-barevná verze "Naica® system" Crystal Digital PCR™	29
5.1.1.2.	6-barevná verze "Naica® system" Crystal Digital PCR™	33
5.1.2.	Detekce bodové mutace <i>BRAF V600E</i> pomocí komerčního kitu IDBRAF	37
5.2.	Detekce vybraných bodových mutací na platformě QIAcuity Four dPCR system (QIAgen)	43
5.2.1.	Optimalizace podmínek dPCR.....	43

	5.2.2. Detekce sledovaných bodových mutací u vybraných pacientů.....	48
6	DISKUZE.....	55
7	ZÁVĚR.....	59
8	LITERATURA.....	60
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65

1 ÚVOD

Rychlý rozvoj technik analýzy lidského genomu, především v oblasti sekvenování v posledních 20-25 letech, odhalil mnoho kandidátních genů a přispěl k pochopení mechanismu vzniku řady hematologických malignit, kterého nebylo možné dosáhnout s využitím původních vyšetřovacích metod (Machová-Poláková *et al.*, 2019). Detekce genetických změn se stala nedílnou součástí komplexní diagnostiky hematologických malignit. Výsledky molekulárních vyšetření přispívají k určení správné diagnózy, ovlivňují výběr terapeutické strategie a poskytují cenné informace, na základě kterých lze předpovědět klinický průběh onemocnění (stanovit prognózu) (Kantarjian *et al.*, 2019; Maitre *et al.*, 2019; Martelli *et al.*, 2020). Navíc molekulární změny, které charakterizují maligní buňky při stanovení diagnózy, lze následně využít jako markery onemocnění a pomocí vysoce citlivých nástrojů molekulární analýzy tak sledovat klinický vývoj onemocnění v čase.

Ke sledování bodových mutací *BRAF*^{V600E} a *c-KIT*^{D816V} se v rutinní laboratorní diagnostice LMB HOK FNOL používá kvalitativní metoda AS-PCR s detekcí end-point PCR produktů pomocí gelové elektroforézy (Schumacher *et al.*, 2008; Arcaini *et al.*, 2012). I přes prokazatelnou citlivost alelově specifické amplifikace cílových bodových mutací neposkytuje tato metoda kvantitativní informaci o alelové náloži v čase. Jednou z výhod digitální PCR (dPCR) ve srovnání se standardní kvantitativní PCR (qPCR) je absolutní kvantifikace bez nutnosti standardů. Proto jsme se rozhodly otestovat dPCR jako alternativní metodu pro přesnou a ve srovnání s AS-PCR kvantitativní analýzu vybraných bodových mutací (Quan *et al.*, 2018; Cilloni *et al.*, 2019).

Teoretická část této diplomové práce byla věnována přehledu recentních poznatků v oblasti analýzy bodových mutací pomocí digitální PCR v kontextu s alternativními detekčními metodami založenými na alelově specifické amplifikaci resp. sekvenování.

Experimentální část byla zaměřena na analýzu vybraných bodových mutací, které asociují s patogenezi akutní myeloidní leukemie, vlasatobuněčné leukemie a systémové mastocytózy a byla provedena na 2 nejnovějších platformách dPCR – "Naica® system" Crystal Digital PCRTM (Stilla Technologies) a QIAcuity (Qiagen). Prezentované výsledky byly získány na základě analýzy bodových mutací genu *IDH1* a genu *BRAF* pomocí komerčně dostupného multiplexního systému firmy ID Solutions u pacientů s AML resp. HCL. Další část byla věnována optimalizaci detekce mutací D816V genu *c-KIT* a V600E genu *BRAF* pomocí dPCR na systému QIAcuity. Metody byly využity ke sledování těchto

mutací u vybraných pacientů, kteří jsou v ambulantní péči HOK FNOL s diagnózou systémová mastocytóza, vlasatobuněčná leukémie resp. akutní myeloidní leukémie.

2 CÍLE PRÁCE

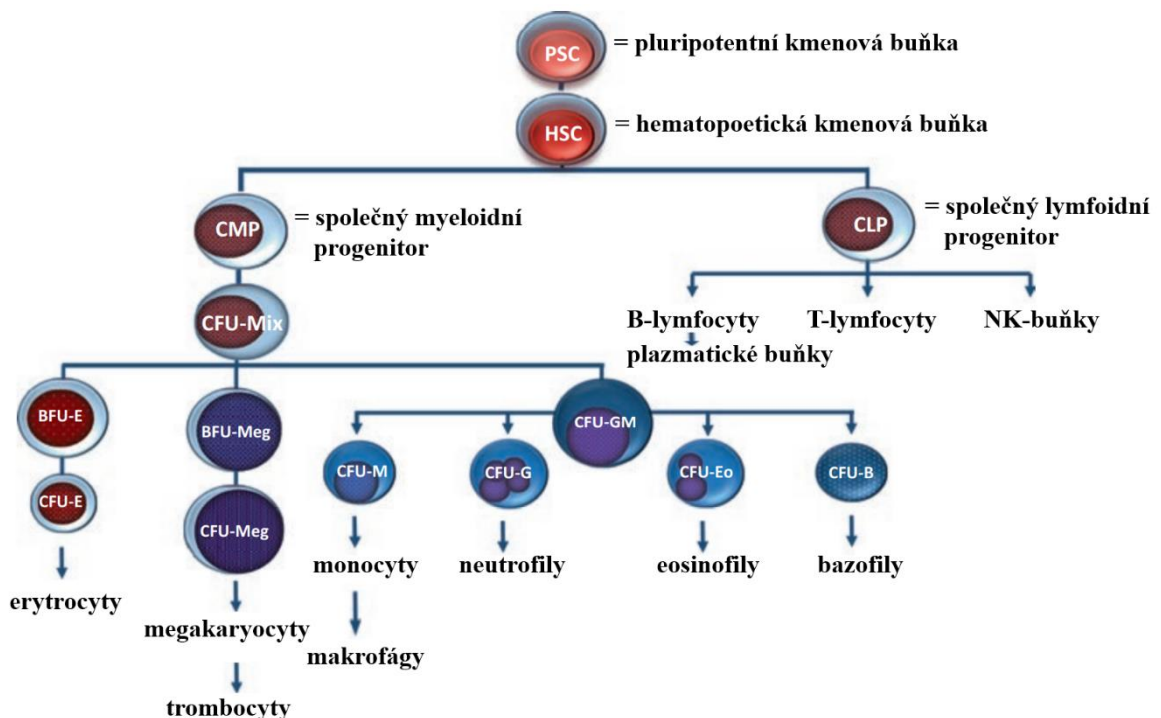
1. Vypracovat stručný přehled recentních poznatků v oblasti analýzy bodových mutací metodami molekulární genetiky s důrazem na dPCR a možnostmi jeho využití v hematookologii.
2. Optimalizovat metodu dPCR pro detekci bodových mutací D816V genu *c-KIT* u systémové mastocytózy a mutace V600E genu *BRAF* u vlasatobuněčné leukémie.
3. Zhodnotit získané výsledky v kontextu perspektivy uplatnění dPCR při detekci bodových mutací u vybraných hematologických onemocnění v laboratorní praxi v LMB HOK FNOL.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Krvetvorba a základní principy vzniku hematologických onemocnění

Hematopoéza (krvetvorba) je fyziologický proces, který dává vznik všem krvetvorným buňkám. Zabezpečuje tak kontinuální obnovu krvetvorných elementů, které mají nezastupitelnou funkci v řadě pro život esenciálních procesů, jako je přenos kyslíku (erytrocyty), srážení krve (trombocyty) a v neposlední řadě správná funkce imunitního systému (B-, T-lymfocyty, NK-buňky) (Jagannathan-Bogdan *et Zon*, 2013; Ratajczak, 2019).

Krvetvorba začíná na úrovni pluripotentní krvetvorné kmenové buňky, která dává na základě programu diferenciací vznik multipotentním buňkám myeloidní nebo lymfoidní krvetvorné linie, které se následně cestou nezralých krvetvorných elementů (blastů) dále dělí a diferencují a dávají vznik vysoce specializovaným zralým krvetvorným buňkám, které v lidském těle plní specifické funkce (Obr. 1) (DiJulio, 1991; Ratajczak, 2019).



Obr. 1: Zjednodušené schéma hematopoézy. PSC dává vznik HSC, která diferencuje buď na CMP nebo CLP. Z CMP vznikají zralé buňky myeloidní řady – erytrocyty, megakaryocyty, monocyty, granulocyty (neutrofilly, eosinofily, bazofily). Z CLP vznikají B, T lymfocyty a NK buňky (upraveno dle Ratajczak, 2019).

Vznik a diferenciací krve tvorných buněk je složitý, několikakrokový proces, který ovlivňuje mnoho faktorů. Zásah do procesu vzniku krve tvorných buněk na úrovni jejich dělení, diferenciací a/nebo programovaného zániku vede k narušení fyziologické krve tvorby. Výsledkem je abnormální krve tvorba, která vede ke vzniku onemocnění krve jak maligního, tak nemaligního charakteru.

Hematologické malignity je souhrnné označení pro nádorová onemocnění, která vznikají na úrovni myeloidních nebo lymfoidních krve tvorných buněk na různých stupních diferenciací od nezralých po plně vyztalé buňky. Na vzniku a klinickém průběhu hematologických malignit se zásadním způsobem podílejí genetické změny, které zasahují do funkce genů s klíčovou rolí v procesech dělení, diferenciací nebo zániku krve tvorných buněk. Mutacemi změněné geny následně nejsou schopny plnit svou funkci v rámci krve tvorby, svou funkci mění, ztrácí, nebo naopak díky mutacím získávají novou, abnormální funkci. V principu však buňky získávají díky mutacím selekční výhodu vůči buňkám okolí, vzniká maligní klon, který obvykle dál akumuluje další mutace, které jsou nezbytné k udržení maligního fenotypu (Jurlander, 2017).

Vznik a rozvoj hematologických onemocnění doprovází řada různorodých, obvykle získaných genetických změn, které lze prokázat na mikroskopické úrovni jako numerické (změny v počtu) nebo strukturální (změny v morfologii) abnormality karyotypu, nebo se jedná o změny na molekulární úrovni, které se prokazují analýzou DNA (RNA) v podobě genových mutací (substituce/záměny, inserce nebo delece nukleotidů) nebo změn v expresi genů. Určení genetických změn v nádorovém klonu je dnes nedílnou součástí komplexní diagnostiky hematologických malignit, je nezbytné pro přesnou a včasnou diagnostiku, pomáhá odhadnout klinický průběh onemocnění (stanovit prognózu), volit léčebný postup a monitorovat odpověď pacientů na léčbu (Arber *et al.*, 2016, Alaggio *et al.*, 2022).

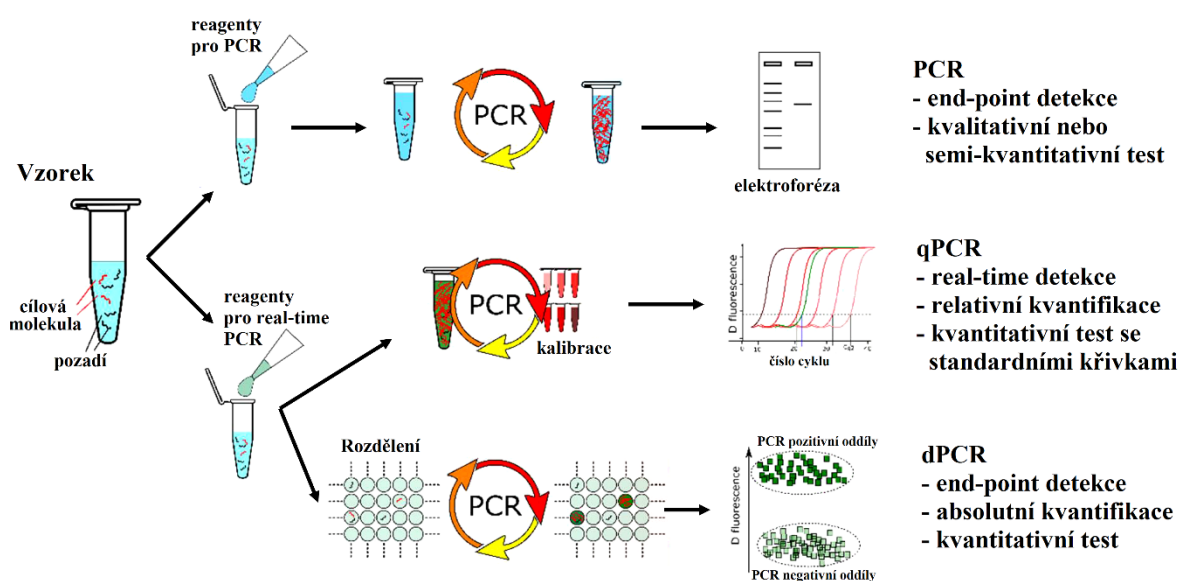
Klinické laboratoře specializované na oblast molekulární charakterizace hematologických onemocnění nabízí v rámci rutinní diagnostiky širokou škálu cílených vyšetření pomocí různorodých metod molekulární analýzy (Machová-Poláková *et al.*, 2019). V rámci rozvoje laboratorní diagnostiky v Laboratoři molekulární biologie HOK FNOL (LMB HOK FNOL) jsme se v této diplomové práci zaměřily na detekci bodových mutací (jednonukleotidové záměny v nukleotidové sekvenci DNA), které asociují s patogenezi vybraných hematologických onemocnění pomocí digitální PCR.

3.2. Digitální PCR

Digitální PCR je vysoce specifická, citlivá a časově nenáročná technika, která umožňuje kvantifikaci genové exprese nebo detekci bodových mutací se širokými možnostmi uplatnění v oblasti molekulární analýzy hematologických onemocnění (leukemií, lymfomů, myelomu, chronických myeloproliferativních onemocnění) (Hrstka *et al.*, 2014; Cilloni *et al.*, 2019; Machová-Poláková *et al.*, 2019; Galimberti *et al.*, 2022).

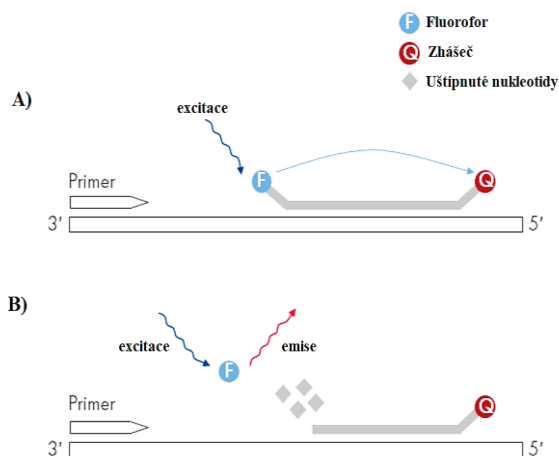
3.2.1. Princip digitální PCR

V principu se dPCR zakládá na základním konceptu konvenční polymerázové reakce C. Mullise, tedy na end-point detekci amplifikace cílové oblasti genomu pomocí DNA polymerázy a páru oligonukleotidových primerů, které jsou specifické pro vybranou oblast (Mullis *et al.*, 1986). Ve srovnání s konvenční PCR je u dPCR analyzovaný vzorek rozdělen do velkého množství reakčních oddílů a následně v každém oddílu, který obsahuje cílovou molekulu, probíhá samostatná end-point PCR (Obr. 2) (Quan *et al.*, 2018).

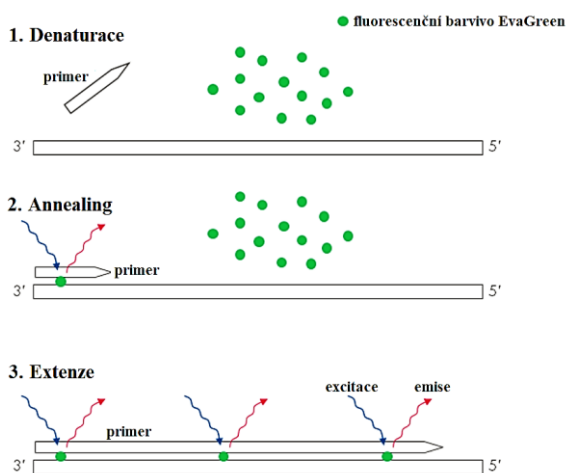


Obr. 2: Srovnání metod PCR (upraveno dle Quan *et al.*, 2018).

Co se týče složení reakční směsi, dPCR kopíruje princip PCR v reálném čase (kvantitativní PCR, qPCR) (Obr. 2), tedy kromě DNA polymerázy a páru oligonukleotidových primerů využívá (v závislosti na zvoleném detekčním přístupu) fluorescenčně značenou sondu (krátká sekvence nukleotidů, která hybridizuje k cílové sekvenci DNA a umožňuje její vysoce specifickou detekci) (Obr. 3) nebo fluorescenční barvivo (nejčastěji EvaGreen), které se během PCR amplifikace zabudovává do DNA (Obr. 4) (Hrstka *et al.*, 2014).



Obr. 3: Princip detekce PCR produktu – použití hydrolyzační sondy. Taqman sondy jsou sekvencně specifické oligonukleotidy s připojeným fluoroforem na 5' konci a zhášečem na 3' konci bránícím fluorescenci (část A). Během PCR je sonda v průběhu extenze štěpena od 5' konce Taq polymerázou, čímž dojde k odštěpení fluoroforu a emisi fluorescence (část B). Míra fluorescenčního signálu volného fluoroforu odpovídá množství PCR produktu (upraveno dle Qiagen, 2021).



Obr. 4: Princip detekce PCR produktu – použití fluorescenčního barviva EvaGreen. Fluorescenční barvivo se váže na vznikající dsDNA, po navázání dochází ke konformační změně barviva, které následně vydává fluorescenční signál určité vlnové délky. Toto barvivo umožňuje analýzu bez nutnosti syntézy specifické značené sondy (upraveno dle Qiagen, 2021).

Na základě detekované fluorescence je v dalším kroku dPCR každý reakční oddíl samostatně vyhodnocen jako pozitivní nebo negativní. Tímto přístupem lze pomocí dPCR zachytit i stopové množství cílových molekul v analyzovaném vzorku, což je klíčové při templátech s minoritním zastoupením cílových alelových variant (mutací). Ve srovnání s qPCR probíhá během dPCR absolutní kvantifikace cílových molekul bez použití standardní křivky (Hrstka *et al.*, 2014; Cilloni *et al.*, 2019).

3.2.2. Platformy digitální PCR

Rozlišují se 2 základní platformy digitální PCR, které odlišuje vlastní mechanismus vytváření reakčních oddílů. Původní, dropletová digitální PCR (ddPCR), vytváří reakční oddíly nanolitrových až pikolitrových objemů pomocí vodno/olejové emulze (Pecoraro *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2022). Alternativní, čipová/nanoplate digitální PCR je založena na technologii mikrofluidních čipů, při které je vzorek rovnoměrně rozdělen do stovek až tisíců fixních reakčních oddílů nanolitrových objemů. Čipové platformy bývají v některých publikacích souhrnně označovány jako digitální PCR (dPCR), protože ve srovnání s ddPCR nevyužívají mechanismus dropletových reakčních oddílů (Váňová *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2022; Tiwari *et al.*, 2022).

Na bázi dropletů (kapiček) fungují původní systémy QX100™/200™ ddPCR Systém (Bio-Rad Laboratories) a tento princip využívá i novější řada Naica® Crystal Digital PCR System (Stilla Technologies). Široká nabídka čipových digitálních systémů zahrnuje QuantStudio™ 3D (Thermo Fisher Scientific), QuantStudio™ Absolute Q™ (Thermo Fisher Scientific), BioMark™ HD (Fluidigm), Clarity™/ Clarity Plus™ (JN Medsys) a QIAcuity (Qiagen). Technologie dPCR ve výše uvedených systémech digitální PCR byla podrobně rozebrána v řadě přehledných publikací (Tan *et al.*, 2022; Tiwari *et al.*, 2022). Tato diplomová práce se dále věnuje digitálnímu systému Naica® (Stilla Technologies) a QIAcuity (Qiagen), na kterých byla provedena experimentální část práce.

3.2.2.1. Naica® krystalová digitální PCR (Stilla Technologies)

Krystalová digitální PCR Naica® je založena na mikrofluidní technologii, která integruje celý proces ddPCR na bázi vodno/olejových emulzní reakčních oddílů na mikrofluidní čip. Reakční směs je v prvním kroku rozdělena do dvourozměrné monovrstvy kapiček, které svým pravidelným uspořádáním připomínají atomy v křišťálových mřížkách. Vznikající dropletové krystaly představují jednotlivé reakční oddíly. Dostupné mikrofluidní čipy jsou

tvořeny 4 resp. 16 (dle varianty čipu) identickými systémy mikrofluidních kanálek (každý určený pro 1 vzorek). Hlavní součástí systému kanálek je tenká obdélníková komůrka spojená v jednom rohu s 33 tryskami produkujícími 25 000-30 000 monodisperzních kapiček o objemu ~ 0.43 nl. Kanálky jsou naplněny tekutinou se stabilizátory emulze. Tvorba kapiček a vlastní PCR amplifikace probíhá v termálním cycleru Geode, který má kapacitu celkem 3 různé čipy na experiment. Po ukončení PCR se čipy přemístí do zařízení Prism3 (3 detekční kanály) nebo Prism6 (6 detekčních kanálů), které snímá end-point fluorescenci v reakčních oddílech pomocí automatizovaného fluorescenčního mikroskopu. Analýzu a zpracování dat provádí software Crystal MinerTM. Ve srovnání s konkurenčními systémy digitální PCR nabízí Naica® system jako jediná platforma možnost získání PCR produktu (po jeho amplifikaci a načtení v zařízení Prism), který je následně možné dál analyzovat. Aktuálně dostupné čipy systému Naica® Crystal Digital PCR umožňují v jednom experimentu provést analýzu 12 (safiřový čip) až 48 (opálový čip) vzorků (Madic *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2022; Tiwari *et al.*, 2022).

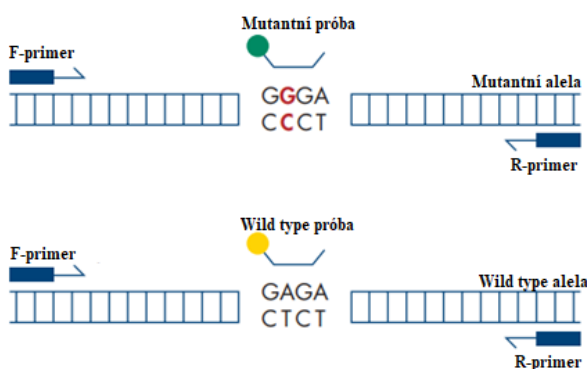
3.2.2.2. QIAcuity digitální PCR systém

QIAcuity je plně integrovaná platforma dPCR založená na technologii čipů (nanoplate). Jedná se o mikrofluidní čipy, které mají kapacitu 24 nebo 96 vzorků, v každé jamce 8 500 resp. 26 000 uniformních reakčních oddílů. Jediný krok, který probíhá mimo QIAcuity dPCR systém, je samotné plnění čipu reakční směsí. Po nanesení reakční směsi je nanoplate utěsněn flexibilním uzávěrem a vložen do přístroje QIAcuity, ve kterém probíhá integrovaný a plně automatizovaný proces rozdělení vzorků do reakčních oddílů, amplifikace i samotná detekce. Distribuce reakční směsi ze vstupních jamek nanoplate do reakčních oddílů se provádí zanořením 24/96 hrotů do vrchního flexibilního uzávěru a posléze do vstupních jamek s reakční směsí. Vytvořený peristaltický tlak čerpá reakční směs ze vstupních jamek přes mikrokanálky do reakčních oddílů nanoplate. Spojovací kanály mezi reakčními oddíly se následně systematicky uzavřou automatizovaným válcováním. Následující end-point PCR probíhá v integrovaném termocykleru. Během end-point PCR dochází v průběhu každého cyklu amplifikace k duplikaci cílové molekuly, přičemž reakční oddíl, ve kterém se nachází cílová molekula, emituje fluorescenci. Po ukončení PCR jsou reakční oddíly vyhodnocovány pomocí detekčního zařízení (fluorescenční mikroskopický systém), které snímá fluorescenci ve vybraných detekčních kanálech (kapacita 2 až 5 různých fluoroforů, dle formátu QIAcuity dPCR systému) a hodnotí počet pozitivních/fluoreskujících reakčních oddílů. Podíl pozitivních a negativních reakcí hodnotí automaticky QIAcuity Software Suite,

výstupní hodnotou je počet kopií cílové molekuly na μl (Qiagen, 2021; Shi *et al.*, 2022; Tan *et al.*, 2022; Tiwari *et al.*, 2022).

3.3. Využití digitální PCR při detekci bodových mutací

Nejjednodušší detekční systémy založené na analýze bodových mutací pomocí dPCR využívají pár oligonukleotidů, které ohraničují cílovou sekvenci, a 2 próby – mutantní a *wild type*. Nejčastěji se využívají duálně značené TaqMan próby, které po označení odlišným fluoroforem umožňují provádět alelovou diskriminaci v 1 reakci (Obr. 5). Složitější detekční systémy využívají různé úrovně multiplexování a simultánně detekují několik alelových variant najednou (Whale *et al.*, 2016).



Obr. 5: Princip detekce bodových mutací v duplexních systémech dPCR (upraveno dle Qiagen)

3.4. Detekce bodových mutací na bázi alelově specifické amplifikace

Zlatým standardem detekce známých bodových mutací zůstává v oblasti rutinní laboratorní diagnostiky alelově specifická PCR, původně popsána jako Amplification Refractory Mutation System (ARMS) v roce 1989 (Newton *et al.*, 1989). Detekční systémy pracující na principu AS-PCR bývají postaveny na páru alelově specifických oligonukleotidů (jeden specifický pro mutantní alelu, druhý specifický pro *wild-type* alelu). Sekvence oligonukleotidů je téměř identická, odlišují se pouze v oblasti bodové mutace. Při optimálních podmínkách PCR lze pomocí AS-PCR dosáhnout vysoce citlivou alelovou diskriminací mezi mutantní a *wild-type* alelou, přičemž mutantní primer amplifikuje pouze mutantní alelu a *wild-type* primer amplifikuje pouze alelu bez mutace. Detekce *end point* PCR produktů probíhá po elektroforetické separaci PCR produktů v agarózovém gelu

v detekčním zařízení. Alternativou je detekce fluorescenčně značených PCR produktů fragmentační analýzou po jejich separaci kapilární elektroforézou. I přes vysokou citlivost a finanční nenáročnost ve srovnání s dPCR výsledek AS-PCR není kvantitativní. Dalším limitem bývají vyšší požadavky na množství vstupního materiálu, což může omezit molekulární diagnostiku, pokud genetický materiál není dostupný v požadovaném množství (Quan *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2022).

3.5. Detekce bodových mutací pomocí sekvenačních technik

Druhou klíčovou technikou molekulární analýzy bodových mutací je sekvenování dle Sangera. Princip se zakládá na asymetrické PCR, kdy je cílový úsek ve srovnání s konvenční PCR amplifikován pouze pomocí 1 sekvenčně specifického primeru (forward nebo reverse) v reakční směsi, která obsahuje DNA polymerázu, dNTPs a 4 různé ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), každý značený jinou fluorescenční barvou. V místě zabudování ddNTP do amplifikované sekvence dochází k ukončení PCR. PCR produkty jsou separovány kapilární elektroforézou a získává se sekvenogram, který lze analyzovat ve speciálních programech pro detekci genových mutací. Ve srovnání s AS-PCR a dPCR poskytuje sekvenční analýza nespécifický, ale celkový náhled do nukleotidové sekvence vybrané oblasti. Vzhledem na citlivost detekce na úrovni 15-20 % nelze touto metodou prokázat bodové mutace přítomné pod tímto detekčním limitem. Obdobně jako AS-PCR ani výstup ze sekvenční analýzy dle Sangera není kvantitativní a ve srovnání jak s AS-PCR, tak s dPCR představuje časově náročnější analýzu (Bruijns *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019).

Všechny limity konvenční sekvenční analýzy dle Sangera lze v principu překonat pomocí platform sekvenování nové generace (NGS), které dle požadavků a nastavených podmínek umožňují provádět paralelní analýzu několika vybraných cílových oblastí až celého exomu, případně celého genomu. Uplatnění NGS v oblasti rutinní molekulární analýzy bodových mutací je vzhledem na finanční, časovou a technickou náročnost zatím limitováno. Na druhou stranu možnost paralelní detekce velkého počtu mutací v 1 vzorku s kvantitativním výstupem řadí tyto techniky mezi mimořádně perspektivní a jejich uplatnění v oblasti molekulární diagnostiky závisí na možnostech laboratoře. I když je citlivost NGS a dPCR srovnatelná, obecně, vzhledem na diametrálně odlišný výstup, který lze technikami NGS ve srovnání s dPCR získat, nelze tyto 2 techniky molekulární analýzy plně srovnávat (Galimberti *et al.*, 2022).

3.6. Využití digitální PCR při detekci bodových mutací u vybraných hematologických malignit

3.6.1. Akutní myeloidní leukemie s mutacemi *IDH1/IDH2*

Akutní myeloidní leukemie (AML) je klonální onemocnění krvetvorby charakterizované přítomností proliferujících, abnormálně diferencovaných buněk hematopoetického systému v kostní dřeni, periferní krvi a případně v extramedulárních tkáních. Vzhledem na mimořádně rozdílný klinický průběh a odpověď na léčbu představuje AML prototyp onemocnění pro cílenou terapii, která by mohla zlepšit přežití pacientů (DiNardo *et al.*, 2020). V posledních letech byly do terapeutické praxe uvedeny nové léky na bázi cílené terapie včetně inhibitorů FLT3 kinázy (midostaurin a gilteritinib) (Stone *et al.*, 2017; Lambert *et al.*, 2019) a inhibitorů *IDH1*, *IDH2* (ivosidenib a enasidenib), které radikálně změnilly možnosti terapie pacientů s AML a přispěly k lepším léčebným výsledkům. Na základě nových poznatků v oblasti charakterizace genetické patogeneze AML (nové kandidátní geny) byla přehodnocena klasifikace dle WHO (Arber *et al.*, 2016) a byly definovány prognostické skupiny (nízké, střední, vysoké riziko), které se zásadně liší v terapeutickém přístupu (chemoterapie, transplantace). Osobitou pozornost dostává monitorování MRD (Galimberti *et al.*, 2022).

Bodové mutace genů pro izocitrátdehydrogenázy *IDH1* a *IDH2* bývají asociovány se solidními tumory (gliomy), ale lze je prokázat i u 10-20 % AML, resp. u dalších hematologických onemocnění myeloidní linie (myelodysplastický syndrom, *BCR/ABL* negativní chronické myeloproliferativní onemocnění). U hematologických onemocnění bývají detekovány mutace typu jednonukleotidových záměn, které se vyskytují vždy v exonu 4 v konkrétních pozicích (mutační hot-spoty) a mění zbytky argininu v kodonech R132 (gen *IDH1*), R140 (gen *IDH2*) nebo R172 (gen *IDH2*). V posledních letech byla publikována řada protokolů, které popisují možnosti detekce *IDH1/2* mutací pomocí dostupných platforem digitální PCR (Grassi *et al.*, 2020). Zajímavé jsou přístupy simultánní detekce všech dostupných mutantních alel v klíčových kodonech *IDH1* nebo *IDH2* genu v multiplexních verzích dPCR. Citlivost detekce cílových mutací v těchto systémech převyšuje citlivost sekvenování dle Sangera a dosahuje citlivosti detekce mutací pomocí alelově specifické PCR. Ve srovnání se systémy založenými na bázi alelově specifické amplifikace, které by amplifikovaly každou ze 4 možných mutantních variant v samostatné PCR reakci, multiplexní varianty dPCR umožňují detekci všech 4 variant v jediné reakci. Jako slibné terapeutické cíle v éře inhibitorů *IDH1/IDH2* se mutace *IDH1/IDH2* intenzivně

hodnotí i jako markery minimální zbytkové nemoci (ukazatele, které stabilně asociují s klinickým průběhem onemocnění a umožňují monitorovat klinický stav pacienta) (Cilloni *et al.*, 2019).

3.6.2. Aktivační mutace D816V genu *c-KIT* u systemové mastocytózy

Mastocytóza je vzácná neoplázie, která se vyznačuje širokou škálou klinických příznaků v důsledku nadměrné proliferace a zvýšené akumulace morfoloicky a imunofenotypově abnormálních klonálních žírných buněk v různých orgánech a tkáních. Mastocyty patří mezi efektorové buňky imunitního systému, které se přímo nebo prostřednictvím komunikace s jinými buňkami podílejí na vrozené i získané imunitě (Pardanani, 2021).

U většiny (> 80 %) pacientů se SM lze prokázat bodovou mutací D816V v exonu 17 genu *c-KIT*, méně časté jsou další alelové varianty v kodonu D816 (D816Y, D816F, D816H a D816I) nebo mutace v jiných kodonech (Martelli *et al.*, 2020). Díky mutaci D816V dochází ke konstitutivní aktivaci receptoru *c-KIT* (bez potřeby růstového faktoru SCF, stem cell faktor), což má zásadní vliv na navazující signální dráhy, které regulují klíčové procesy buněčné homeostázy včetně dráhy PI3K (reguluje buněčný metabolismus, růst, migraci, přežití a angiogenezi), STAT (kontroluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití) a mTORC (ovlivňuje buněčný růst, syntézu proteinů, buněčný cyklus). Abnormálně aktivované signální dráhy odpovídají za agresivní průběh SM a představují potenciální terapeutické cíle. Zlatým standardem diagnostického algoritmu při podezření na SM je vyšetření mutace D816V v kostní dřeni nebo v bioptované tkáni. Většina pacientů vykazuje nízké zastoupení neoplastických mastocytů v kostní dřeni, u některých subtypů (zejména u indolentní formy SM) nedosahuje alelová nálož 1 %. Proto je při detekci mutace D816V žádoucí vybírat z vysoce citlivých metod. Mezi nejvíce senzitivní přístupy identifikace a kvantifikace mutace D816V s detekčním limitem < 0.01 % pozitivních buněk patří kvantitativní PCR pomocí alelově specifických oligonukleotidů (Kristensen *et al.*, 2014), recentně pak platformy založené na digitální PCR (Tan *et al.*, 2022).

3.6.3. Bodová mutace genu *BRAF* V600E u vlasatobuněčné leukemie

Vlasatobuněčná leukemie patří do heterogenní skupiny onemocnění zralých B lymfocytů, které charakterizuje nález tzv. vlasatých buněk (z angl. *hairy*). Diagnóza HCL je výsledkem komplexního zhodnocení morfoloie buněk v odebraném vzorku kostní dřene (trepanobiopsie), zhodnocení imunofenotypu (povrchové antigeny buněk stanovené průtokovou cytometrií) a na molekulární úrovni na základě nálezů somatické mutace *BRAF* V600E. Bodová mutace *BRAF* V600E se vyskytuje u 70-100 % pacientů s vlasatobuněčnou

leukemií a asi u poloviny (50 %) případů histiocytózy z Langerhansových buněk, nejčastěji u pacientů s postižením kůže a centrálního nervového systému (Rodriguez-Galindo *et Allen*, 2020). Mutace *BRAF* V600E se řadí od její identifikace v roce 2011 mezi klíčové molekulární markery diagnostiky HCL (Tiacci *et al.*, 2011). Klinický význam nálezu mutace *BRAF* u hematologických onemocnění dál narůstá v éře cílené terapie díky dostupným inhibitorům kinázy *BRAF* (Maitre *et al.*, 2019). V nedávné studii na skupině 30 rizikových pacientů s HCL bez odpovědi nebo s nedostačující odpovědí na léčbu byla po podání léku vemurafenib (inhibitor *BRAF*) v kombinaci s imunoterapií (rituximab) dosažena kompletní remise u 87 % případů (Tiacci *et al.*, 2021). Vzhledem na téměř kompletní incidenci mutace *BRAF* V600E u HCL a potenciál cílené terapie je její přesná a citlivá detekce mimořádně žádoucí. Guerrini *et al.* detekoval mutaci V600E pomocí ddPCR a ve srovnání s qPCR prokázal vyšší citlivost ddPCR při detekci minimální zbytkové nemoci (Guerrini *et al.*, 2016). V roce 2020 proběhla mezilaboratorní kontrola kvality zaměřená na využití ddPCR při detekci mutace *BRAF*, které se zúčastnilo 8 laboratoří, ve studii bylo provedeno srovnání limitu detekce ddPCR (0.02 %) a NGS (0.3 %) (Dong *et al.*, 2020).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Soubor pacientů

V rámci experimentální práce byla provedena retrospektivní DNA analýza vzorků kostní dřeně nebo periferní krve pacientů diagnostikovaných a léčených na HOK FNOL. Do studie byly vybrány dostupné vzorky DNA od pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukemie, vlasatobuněčná leukemie a systémová mastocytóza se známým mutačním profilem genů *IDH1/2*, *BRAF* resp. *c-KIT* ve vybraných exonech (mutačních *hot-spotech*). Kontrolní soubor (sloužil jako negativní kontrola) tvořily vzorky DNA získané od zdravých dárců dostupné v LMB HOK FNOL.

Genomická DNA byla izolována z KD v LMB HOK FNOL pomocí komerčního kitu Gentra® Puregene® Blood Kit dle doporučení výrobce (Qiagen) nebo pomocí automatického izolátoru NK MagNA Pure Compact (Roche Life Science) a homogenizována v roztoku 10 mmol/l TRIS, pH = 7.5. Koncentrace a čistota DNA byla ověřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific). Vzorky DNA byly uchovávány při -80 °C. Mutační hot-spoty genů *IDH1/IDH2* (kodony R132, exon 4), *BRAF* (kodon V600, exon 15) a *c-KIT* (kodon D816, exon 4) byly analyzovány v rámci rutinní molekulární diagnostiky LMB HOK FNOL metodami přímého sekvenování dle Sangera, resp. NGS a/nebo metodou kvalitativní alelově specifické PCR.

4.2. Materiál a příslušenství

4.2.1. Přístroje

Analytická váha FA-2000 (LAB system)

Centrifugy 5430 R, 5424 (Eppendorf)

Izolátor NK MagNA Pure Compact (Roche Life Science)

Ledničky (4-8 °C) (Zanussi)

Mikrovlnná trouba (ECG)

Mrazicí boxy (-20 °C, -80 °C) (Sanyo)

"Naica system" pro Crystal Digital PCR – Geode termocyklér a Prism3 (Stilla Technologies)

NanoDrop ND-1000 Spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)

QIAcuity Four dPCR system (Qiagen)

Qubit 2.0 Fluorometr (Life Technologies)

Genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)
Sestava pro horizontální elektroforézu (Schoeller)
Stolní minicentrifuga C1301 (Labnet)
Termoblok Bio TDB-100 (BioSan)
Termocykléry – peqSTAR (peqlab, VWR), PTC-200 (MJ Research)
Tiskárna P93D (Mitsubishi)
UV transiluminátor Alphaimager 2200 (Alpha Innotech)
UV Transiluminátor ECX-26-MX (Vibber Lourmat)
Vortex (VWR)
Výrobník ledu F100 Compact (CastelMAC Spa)
Zařízení na úpravou vody Direct-Q 3UV (Millipore)
Zdroj k napětí ELFO ST 304 (Apelex)

4.2.2. Počítačové softwary a nástroje

Crystal Miner (Stilla Technologies)
Crystal Reader (Stilla Technologies)
Chromas (Technelysium)
OligoAnalyzer (IDT)
Suite (Qiagen)

4.2.3. Spotřební materiál

Automatické pipety s filtrem, rozsah 1-1000 µl (Eppendorf, Gillson)
Běžné laboratorní sklo
QIAcuity Nanoplate 26k 24-well s adhezivní folií (Qiagen)
Sapphire čipy (Stilla Technologies)
Stojany na zkumavky
Zkumavky 1,5 a 0,5 ml, PCR stripky 0,2 ml (Eppendorf, Invitrogen)

4.2.4. Komerční kity

Gentra Puregene Blood kit (Qiagen)
IDBRAF kit (ID Solutions)
- ARM-IDBRAF(s), TPC-IDBRAF(s)
IDIDH1-2 kit (ID Solutions)
- ARM-IDIDH1-2(s), TPC-IDIDH1-2(s)

QIAcuity Probe PCR kit (Qiagen)

- 4x QIAcuity Probe Mastermix, RNase-free water

Qubit dsDNA BR Assay kit (Invitrogen)

- Qubit dsDNA BR reagent, Qubit dsDNA BR pufr, Qubit dsDNA BR standardy 1, 2

4.2.5. Roztoky a reagencie

Agaróza I a SFR (VWR)

AmpliTaq Gold DNA polymeráza s Gold pufrém a MgCl₂ (Applied Biosystems)

dNTPs (Promega)

Ladder 100 bp DNA (Promega)

Nanášecí pufr Loading Dye 6x (Promega)

PCR ethidium bromid 10 mg/ml (Top-Bio, s.r.o.)

Reverzně osmotická a ultračistá voda (Millipore)

Specifické primery

TBE pufr 10x (Lékárna FN Olomouc)

TRIS 10 mM

4.2.6. Manuály

Crystal Miner Software pro Naica systém (Stilla Technologies): uživatelská příručka (Explorea)

Instructions for use of IDBRAAF kit – IDIDH1-2(s)-25_verP0621-03_EN (ID Solutions)

Instructions for use of IDIDH1-2 kit – IDBRAAF(s)-50_verP0621-04_EN (ID Solutions)

Prism6 & Crystal Reader Software pro Naica systém (Stilla Technologies): uživatelská příručka (Explorea)

QIAquick Spin Handbook (Qiagen, 2020)

QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook (Qiagen, 2019)

QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen, 2021)

QIAcuity User Manual (Qiagen, 2021)

QIAcuity User Manual Extension: Application Guide (Qiagen, 2021)

4.3. Digitální PCR

4.3.1. Určení koncentrace DNA pomocí fluorimetru Qubit 2.0

Koncentrace DNA pro účely dPCR byla stanovena na fluorometru Qubit 2.0 pomocí komerčního kitu Qubit™ dsDNA BR Assay Kit resp. dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) dle postupu uvedeného níže.

Postup:

1. Dle počtu analyzovaných vzorků DNA byl připraven pracovní roztok Qubit™ reagentu a Qubit™ dsDNA BR pufru v poměru 1:200 (na jeden vzorek bylo použito 199 μ l pufru a 1 μ l reagentu). Používané chemikálie byly před začátkem analýzy vytemperovány na laboratorní teplotu.
2. Do dvou tenkostěnných 0,5ml Qubit zkumavek bylo napipetováno 190 μ l pracovního roztoku, do první zkumavky bylo přidáno 10 μ l Standardu 1, do druhé zkumavky 10 μ l Standardu 2 na konečné množství 200 μ l v každé zkumavce.
3. Do zbývajících připravených zkumavek bylo napipetováno 198 μ l pracovního roztoku a 2 μ l DNA vzorku pacientů (které byly předem krátce zvortexovány a zcentrifugovány) na konečné množství 200 μ l v každé zkumavce.
4. Vzorky byly zvortexovány 2 sekundy, stočeny na centrifuze a inkubovány 2 min při laboratorní teplotě. Následně byla změřena jejich koncentrace na fluorometru Qubit 2.0 (dle doporučení výrobce). Koncentrace DNA byla stanovena v jednotce ng/ μ l a následně byla ředěna na požadovanou koncentraci (dle typu dPCR).

4.3.2. Komerčně dostupné reakční směsi, oligonukleotidy a sondy pro dPCR

Pro analýzu pomocí "Naica® system" Crystal Digital PCR™ byly použity amplifikační reakční směsi ARM-IDIDH1-2(s) nebo ARM-IDBRAF(s), které představují součást komerčních kitů IDIDH1-2 kit resp. IDBRAF kit (ID Solutions). Jedná se o hotové reakční směsi složené z Taq polymerázy, Uracil-DNA glykozylázy (UNG) a oligonukleotidů (primery a próby) k detekci bodových mutací v kodonech R132 (kanál FAM) a R172 (kanál Cy5); *wild-type* amplikóny jsou detekovány ve FAM/HEX (gen *IDH1*) resp. HEX/Cy5 (gen *IDH2*) kanálech. Reakční směs v kitu IDBRAF kit obsahuje všechny oligonukleotidy potřebné k simultánní detekci *BRAF wild-type* alely (kanály FAM/HEX), mutací L597/A598/K601 (kanály FAM/HEX) a mutace V600E (kanál HEX/Cy5).

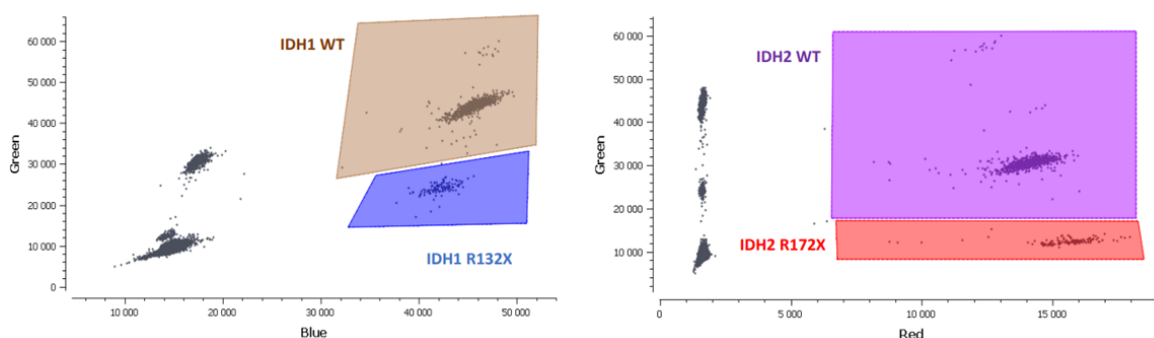
Oligonukleotidové primery a hydrolyzační duálně značené fluorescenční sondy (TaqMan) k detekci bodových mutací D816V (gen *c-KIT*), V600E (gen *BRAF*) na principu duplexní dPCR na QIAcuity Four (Qiagen) byly navrženy vedoucí práce pomocí nástroje OligoAnalyzer™ (<https://www.idtdna.com/>). Sekvence oligonukleotidů a práb byly uvedeny v Tab. 1. PCR amplifikace probíhala pomocí komerčního kitu QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen).

Tab. 1: Oligonukleotidy (primery a sondy) určené k detekci bodových mutací pomocí dPCR. Sondy byly na 3' konci značeny fluoroforem FAM (mutantní alela) nebo HEX (wild type alela), jako zhášec byl použit BHQ1 (Black Hole Quencher®). Do sekvence sond byly v místě nukleotidové záměny (mismatch), která odlišuje mutovanou a *wild-type* alelu, inkorporovány LNA (locked nucleic acid) nukleotidy. Pozice LNA nukleotidu byla v sekvenci sond označena znamínkem + před modifikovaným nukleotidem.

Označení oligonukleotidu	5' modifikace	Nukleotidová sekvence (5'-3')	3' modifikace
KIT_D816_F	-	TCATGGGTCGGATCACAAAGA	-
KIT_D816_R	-	GGACTGTCAAGCAGAGAATG	-
KIT_D816-WT_HEX_LNA	HEX	TGGTCTAGCCAGAG+ACATCAAGAATGA	BHQ1
KIT_D816V_6FAM_LNA	FAM	TGGTCTAGCCAGAG+TCATCAAGAATGA	BHQ1
BRAF_V600_F	-	TCCTTTACTTACTACACCTCAGA	-
BRAF_V600_R	-	ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTG	-
BRAF_V600-WT_HEX_LNA	HEX	TGGTCTAGCTACAG+TGAAATCTCGAT	BHQ1
BRAF_V600E_FAM_LNA	FAM	TGGTCTAGCTACAG+AGAAATCTCGAT	BHQ1

4.3.3. Proces dPCR na platformě Naica® system (Stilla Technologies)

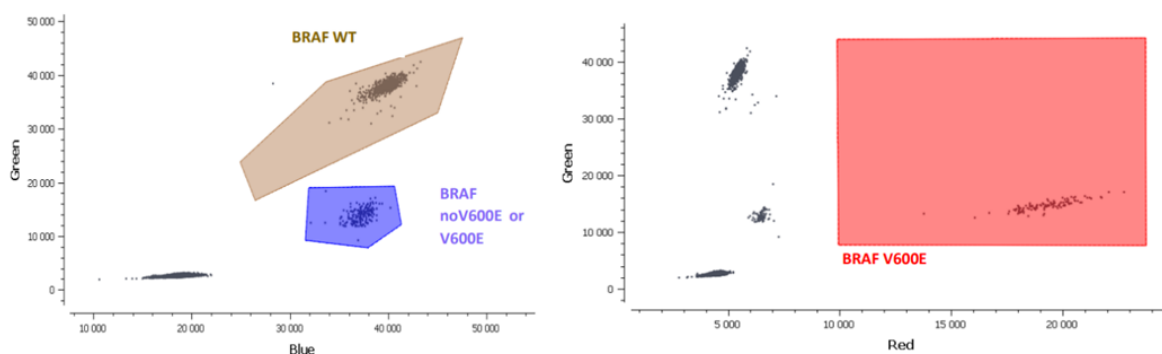
Experiment byl proveden podle příručky IDIDH1-2 kit resp. IDBRAF kit (ID Solutions). Jedná se o komerční multiplexní kvantitativní systémy pro detekci mutací R132X (celkem 5 variant) genu *IDH1* a R172X (celkem 4 varianty) genu *IDH2* (IDIDH1-2 kit) resp. pro detekci mutací L597, A598, V600, a K601 v exonu 15 genu *BRAF* (IDBRAF kit) metodou ddPCR, které jsou kompatibilní se systémem Naica®. Princip detekce byl uveden na Obr. 6 a Obr. 7.



Obr. 6: Detekce bodových mutací *IDH1* a *IDH2* genů pomocí multiplexního systému ID Solutions. Výsledky analýzy dat ve 2D grafu, kde osa x (blue) znázorňuje fluorescenci FAM cílů (pro gen *IDH1*) resp. Cy5 cílů (pro gen *IDH2*), osa y (green) – fluorescence HEX cílů (wild-type alely u obou genů). Genotypizace se provádí dle srovnání intenzit RFU, očekávané hodnoty pro jednotlivé cíle uvádí Tab. 2.

Tab. 2: Očekávané hodnoty intenzity fluorescence (RFU) sledovaných cílů u pozitivní kontroly v komerčním kitu ARM-IDIDH1-2.

Fluorescence (RFU) v jednotlivých kanálech			
Marker	FAM (modrý)	HEX (zelený)	Cy5 (červený)
IDH1 WT	>30000	>30000	-
IDH1 R132X	>30000	<30000	-
IDH2 WT	-	>20000	>7000
IDH2 R172X	-	>20000	>7000



Obr. 7: Detekce bodových mutací genu *BRAF* pomocí komerčního multiplex systému ARM-IDBRAF (ID Solutions). Výsledky analýzy dat ve 2D grafu, kde osa x (blue) – fluorescence FAM cílů (detekce všech mutací *BRAF*) resp. Cy5 cílů (pouze mutace *BRAF* V600E), osa y (green) – fluorescence HEX cílů (*BRAF* wild-type alela). Genotypizace se provádí dle srovnání intenzit RFU, očekávané hodnoty pro jednotlivé cíle uvádí Tab. 3.

Tab. 3: Očekávané hodnoty intenzity fluorescence (RFU) sledovaných cílů u pozitivní kontroly v komerčním kitu ARM-IDBRAF.

Fluorescence (RFU) v jednotlivých kanálech			
Marker	FAM (modrý)	HEX (zelený)	Cy5 (červený)
BRAF WT	>22000	>12000	-
BRAF	>26000	<18000	-
BRAF V600E	-	-	>12000

Průběh:

1. Experiment byl naplánován dle schématu – 1 jamka na čipu na vzorek, 1 jamka na pozitivní kontrolu TPC-IDIDH1-2(s) či TPC-IDBRAF(s), 1 jamka na negativní kontrolu (NEC), 1 jamka na slepý vzorek (NTC, voda).
2. Vzorky DNA i reakční komponenty byly rozmrazeny při laboratorní teplotě a promíchány.
3. Do jamek PCR 0.2ml PCR stripů byla po 10 μ l rozpipetována reakční směs ARM-IDIDH1-2(s) či ARM-IDBRAF(s).
4. Do reakční směsi bylo přidáno 15 μ l templátu (DNA pacienta, pozitivní/negativní kontrola či nuklease-free voda). Roztok byl promíchán pipetováním. Výsledný objem reakce činil 25 μ l.
5. Víčka jamek na čipu (Sapphire chip) byla odšroubována a do jednotlivých jamek na povrch olejové vrstvy bylo opatrně nanášeno 25 μ l připravené reakční směsi z předchozího kroku.
6. Jednotlivé jamky na čipu byly uzavřeny novými, vysokými bílými víčky (součást kitu).

7. Dělení vzorku (tvorba kapiček) a PCR amplifikace DNA probíhala v termálním cykleru Geode (Stilla Technologies). V prvním kroku byla zapnuta tlaková pumpa napojená na termální cykler Geode. Před spuštěním amplifikace musel tlak na displeji dosáhnout ~1200 mbar. Poté byly Sapphire čipy z bodu 6 vloženy do přístroje a byl spuštěn program uveden v Tab. 4.

Tab. 4: Program Crystal Digital PCR (protokol IDIDH1-2 kit a IDBRAF kit).

Krok	Program
(1) Tlakování termocycleru a tvorba kapiček UNG treatment (volitelné)	Dělení vzorků při 40 °C « Sapphire V1 » 45 °C (± 0,5 °C) / 5 min
(2) Počáteční denaturace / Aktivace polymerázy	95 °C (± 0,5 °C) / 10 min
(3) Začátek 45 cyklů	Počátek cyklu 45x
(4) Denaturace DNA	95 °C (± 0,5 °C) / 10 s
(5) Annealing/Extenze	60 °C (± 0,5 °C) / 30s
(6) Ukončení 45 cyklů	Ukončení cyklu
(7) Chlazení	40 °C (± 0,5 °C) / 1 s
(8) Uvolnění tlaku termocycleru a získání kapiček	Release P « Sapphire V1 »

8. Po PCR amplifikaci byly čipy analyzovány na přístroji Prism3 (Stilla Technologies) v programu Crystal Reader Software (Stilla Technologies, verze dle typu Naica® system, 3-barevná nebo 6-barevná verze). Výsledky analýzy byly vyhodnoceny v programu Crystal Miner Software (verze odpovídající typu Naica® system, 3-barevná vs 6 barevná verze).

4.3.4. Proces dPCR na platformě QIAcuity Four dPCR systém (QIAGEN)

Příprava reakční směsi a protokol dPCR:

1. Templátová DNA i reakční komponenty dPCR (QIAcuity Probe PCR master mix, primery, próby, voda) byly rozmrazeny při pokojové teplotě a promíchány.
2. Výchozí reakční mix (dle počtu reakcí v experimentu) byl připraven dle protokolu výrobce QIAcuity Probe PCR master mix (Qiagen) (Tab. 5). Složení reakčních směsí s optimální koncentrací restriční endonukleázy a templátové DNA pro detekci jednotlivých genových mutací byly uvedeny v části Výsledky.

Tab. 5: Složení reakční směsi pro dPCR na platformě QIAcuity dle výrobce Probe PCR Master Mix (Qiagen).

Komponenta	Nanoplate 26k (24-well)	Výsledná koncentrace
4x Probe PCR Master Mix	10 μ l	1x
10x primer–probe mix	4 μ l	0.8 μ M forward primer 0.8 μ M reverse primer 0.4 μ M sonda MUT 0.4 μ M sonda WT
restriční endonukleáza (volitelné)	do 1 μ l	0.025–0.25 U/ μ l
voda (RNase-free)	do výsledného objemu (40 μ l)	
templátová DNA (viz bod 4)	dle typu dPCR	
celkový reakční objem	40 μ l	

3. Reakční směs (bez DNA) byla rozdělena do jamek 0.2 ml PCR stripů.
4. K reakční směsi byla přidána templátová DNA (vzorek pacienta, nebo negativní/pozitivní kontrola nebo voda). Pokud reakční směs obsahovala restriční endonukleázu, vzorky byly inkubovány 10 min při pokojové teplotě.
5. Reakční směs (celý objem, 40 μ l) z bodu 4 byla přepipetována do jednotlivých jamek na čipu dle rozpisu experimentu.
6. Čip byl překryt dodanou adhezivní folií dle doporučení výrobce, umístěn do přístroje QIAcuity Four a byl spuštěn amplifikační program. V Tab. 6 byl uveden výchozí teplotně/časový profil dPCR dle protokolu QIAcuity Probe PCR kit (Qiagen). Podmínky teplotně/časového profilu dPCR pro detekci jednotlivých genových mutací vyžadovaly optimalizaci. Finální podmínky dPCR pro mutace genů *c-KIT* a *BRAF* uvedeny v části Výsledky.

Tab. 6: Teplotně-časový profil dPCR na platformě QIAcuity doporučený výrobcem (Qiagen).

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Hot-start aktivace	95	2 min	
Denaturace	95	15 s	40
Annealing/extension (kombinace)	60*	30 s	

4.4. Alelově specifická PCR

Alelově specifická amplifikace mutačních hot-spotů genů *BRAF* a *c-KIT* probíhá v LMB HOK FNOL v rámci rutinní diagnostiky na úrovni DNA. Amplifikuje se 50-100 ng vstupní DNA v celkovém objemu 25 μ l. Získané PCR produkty se separují agarózovou gelovou elektroforézou s přidavkem ethidium bromidu (0.5 μ g/ml) při standardních podmínkách elektroforézy 5 V/cm po dobu 1 hod a vizualizují se při 260 nm pomocí UV transiluminátoru s dokumentačním zařízením (UV Transiluminátor 312 nm ECX-26-MX (Vibber Lourmat)). V rámci interní kontroly kvality je součástí každé analýzy negativní kontrola (vzorek bez mutace *c-KIT*^{D816V} resp. *BRAF*^{V600E}), pozitivní kontrola (vzorek, který vykazuje mutaci *c-KIT*^{D816V} resp. *BRAF*^{V600E}) a NTC (*non template control*, ve kterém se amplifikuje místo templátové DNA voda).

Princip AS-PCR pro detekci mutace D816V genu *c-KIT* v LMB HOK FNOL se zakládá na systému 3 oligonukleotidů: *c-KIT_F_MUT*, *c-KIT_F* a *c_KIT_R* (Tab. 11). Z nich 1 pár oligonukleotidů slouží k selektivní amplifikaci alely s mutací D816V (*c-KIT_F_MUT* + *c_KIT_R*, délka PCR produktu = 90 nt). Paralelně, v samostatné PCR probíhá amplifikace kontrolní oblasti v rámci 17. exonu genu *c-KIT* (*c-KIT_F* + *c_KIT_R*, délka PCR produktu = 184 bp). Složení reakčních směsí je uvedeno v Tab. 7, teplotně-časový profil PCR reakce v Tab. 8. Princip detekce bodové mutace D816V genu *c-KIT* pomocí AS-PCR je následovný: V PCR pro mutantní alelu je přítomný specifický produkt (90 bp) pouze u pozitivní kontroly a u vzorků, které vykazují mutaci D816V genu *c-KIT*. V PCR pro kontrolní oblast dochází k amplifikaci cílové oblasti (184 bp) ve všech vyšetřovaných vzorcích, včetně pozitivní a negativní kontroly. V NTC nedochází k amplifikaci PCR produktu ani v 1 z reakčních mixů.

Princip AS-PCR pro detekci mutace V600E genu *BRAF* v LMB HOK FNOL se též zakládá na systému 3 oligonukleotidů: *BRAF_V600E_F_MUT*, *BRAF_V600E_F_WT* a *BRAF_V600E_R* (Tab. 11). Ve srovnání s AS-PCR pro mutaci D816V genu *c-KIT* je ASA pro *BRAF* V600E postavena na 2 různých alelově specifických oligonukletidech, které paralelně, v oddělených PCR, amplifikují alelu s mutací V600E (*BRAF_V600E_F_MUT* + *BRAF_V600E_R*) nebo *wild-type* alelu (*BRAF_V600E_F_WT* + *BRAF_V600E_R*). Princip detekce/genotypizace V600E/*wild-type* alel v kodonu V600 genu *BRAF* pomocí AS-PCR je následovný: V PCR pro mutantní alelu je přítomný specifický produkt (148 bp) u pozitivní kontroly a u vzorků, které vykazují mutaci V600E genu *BRAF*, v negativní kontrole amplifikace DNA neprobíhá. V PCR pro *wild-type* alelu dochází k amplifikaci cílové oblasti (148 bp) v negativní kontrole resp. ve všech vyšetřovaných vzorcích, které

nesou *wild-type* alelu (takže i u pozitivních, pokud se nejedná o homozygotní formu *BRAF* V600E mutace). Nález PCR produktu v obou reakčních mixech je průkazem heterozygotního C/A genotypu v kodonu V600 genu *BRAF*. V NTC nedochází k amplifikaci PCR produktu ani v 1 z reakčních mixů. Složení reakčních směsí je uvedeno v Tab. 9, teplotně-časový profil PCR reakce v Tab. 10.

Tab 7: Alelově specifická amplifikace *c-KIT* (D816V).

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 vzorek [μ l]
Reverzně osmotická a ultračistá H ₂ O	-	-	do 25 μ l
PCR Buffer II (-MgCl ₂) (Applied Biosystems)	10x	1x	2,5
MgCl ₂ (Applied Biosystems)	25 mM	2 mM	2,0
dNTPs (Promega)	10 mM	0,2 mM each	0,5
primer c_KIT_F_mut nebo c_KIT_F	100 pmol/ μ l	10 pmol/reakci	0,10
primer c_KIT_R	100 pmol/ μ l	10 pmol/reakci	0,10
Ampli Taq Gold® DNA Polymerase (AB)	5 U/ μ l	0,5 U	0,1
DNA	-	50-100 ng	

Tab. 8: Teplotně-časový profil PCR reakce – *c-KIT*.

Fáze reakce	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Opakování
Aktivace	95	10 min	
Denaturace	95	30 s	
Annealing	58	30 s	36x
Extenze	72	30 s	
Závěrečná extenze	72	10 min	

Tab. 9: Alelově specifická amplifikace *BRAF* (V600E).

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 vzorek [μ l]
Reverzně osmotická a ultračistá H ₂ O	-	-	do 25 μ l
PCR Buffer II (-MgCl ₂) (Applied Bios.)	10x	1x	2,5
MgCl ₂ (Applied Biosystems)	25 mM	2 mM	2,0
dNTPs (Promega)	10 mM	0,2 mM each	0,5
primer BRAF_Fmut, resp. BRAF_Fwt	100 μ M	10 μ M	0,10
primer BRAF_R	100 μ M	10 μ M	0,10
GOLD Taq	5 U/ μ l	0,5 U	0,1
DNA	-	50-100 ng	50-100 ng

Tab. 10: Teplotně-časový profil PCR reakce – BRAF.

Fáze reakce	Teplota [°C]	Čas	Opakování
Aktivace	95	15 min	
Denaturace	95	40 s	
Annealing	58	60 s	38x
Extenze	72	20 s	
Závěrečná extenze	72	10 min	
Chlazení	4	∞	

Tab. 11: Nukleotidové sekvence oligonukleotidových primerů.

Gen	F/R	Sekvence
<i>c-KIT</i>	F	GGTTTTCTTTTCTCCTCCAACC
	R	TGCAGGACTGTCAAGCAGAG
	F_MUT	GATTTTGGTCTAGCCAGCGT
<i>BRAF</i>	F_WT	TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGT
	R	GTA ^A ACTCAGCAGCATCTCAGGG
	F_MUT	TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGA

4.5. Stanovení mutačního profilu genů *IDH1* (exon 4) a *IDH2* (exon 4) metodou NGS

Princip NGS se v LMB HOK FNOL zakládá na masivně paralelním sekvenování vybraných genů na platformě Illumina. K dispozici je komerční panel ClearSeq AML (Agilent), který zahrnuje celkem 48 exonů z 20 různých genů. Jedná se o panel vybraných genů a jejich mutačních hot-spotů, které vykazují diagnostickou/prognostickou hodnotu ve skupině myeloproliferativních onemocnění (MDS, MPN, AML). Součástí panelu jsou i geny *IDH1* a *IDH2*, které se vyznačují mutačním hot-spotem v exonu 4 s rekurentními mutacemi u AML resp. u chronických myeloproliferativních onemocnění obecně.

Kompletní NGS *workflow* zahrnuje přípravu DNA pro NGS knihovnu, přípravu sekvenační knihovny (technologie *target enrichment*), hybridizaci, přečištění hybridizační směsi, ligaci, záchyt ligované DNA, PCR, přečištění PCR, kontrolu knihovny na bioanalyzátoru, sekvenování na přístroji MiSeq (2x150) a vlastní analýzu dat a řídí se standardním operačním postupem pro stanovení mutací pomocí ClearSeq AML panelu metodou NGS (interní dokument LMB HOK FNOL).

5 VÝSLEDKY

5.1. Detekce vybraných bodových mutací na platformě "Naica® system" Crystal Digital PCR™ (Stilla Technologies)

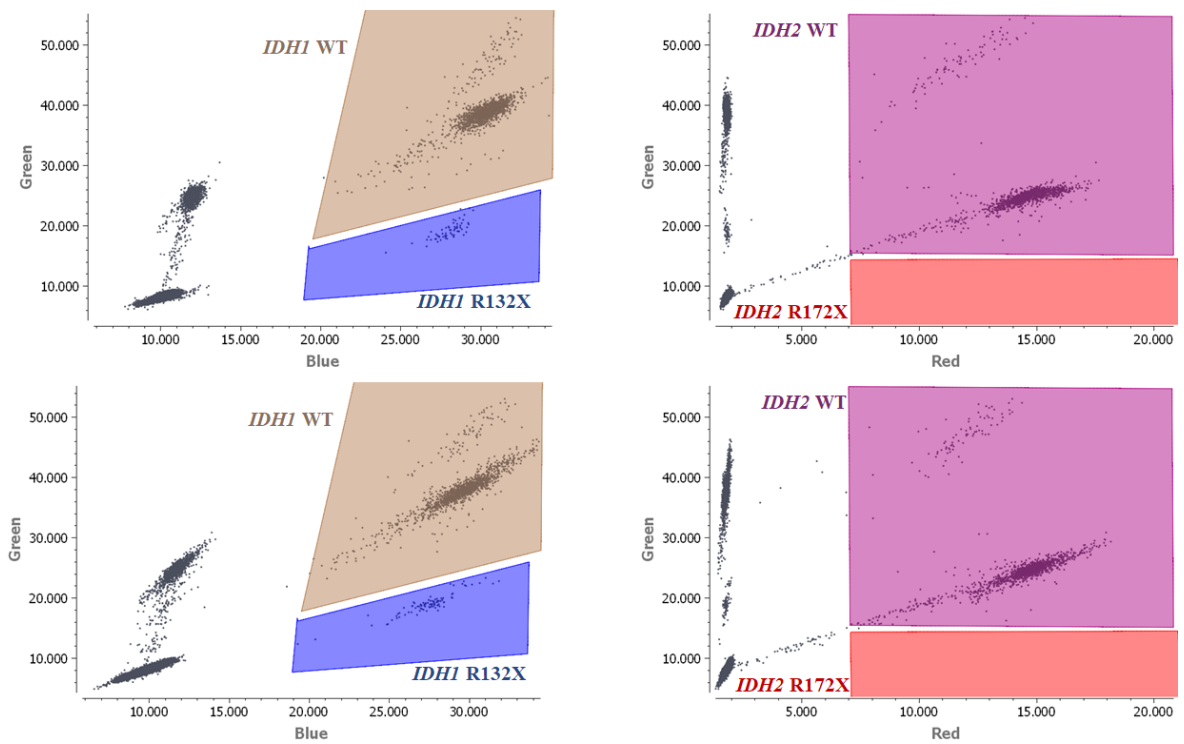
Pro experimenty na platformě Naica® Crystal Digital PCR™ byly zvoleny komerční kity IDIDH1-2 a IDBRAF (ID Solutions), které umožňují simultánně detekovat známé bodové mutace genů *IDH1* a *IDH2* resp. *BRAF*.

5.1.1. Detekce mutací R132X genu *IDH1* pomocí komerčního kitu IDIDH1-2

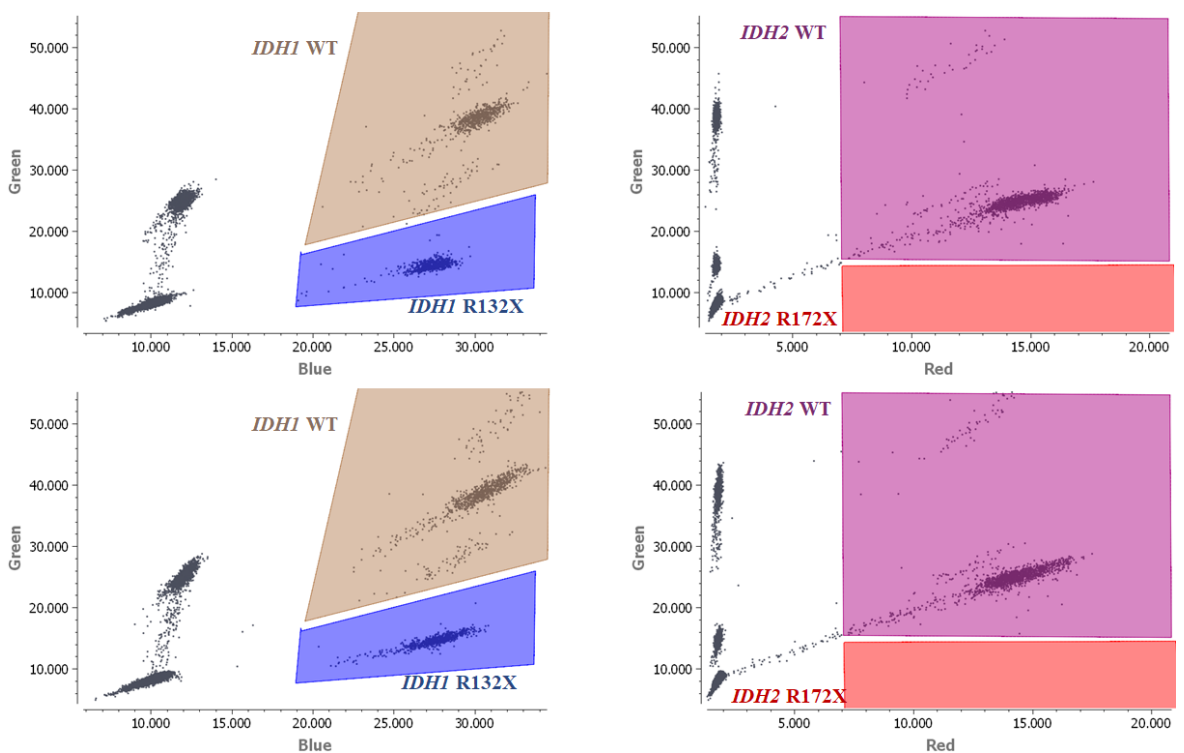
5.1.1.1. 3-barevná verze "Naica® system" Crystal Digital PCR™

Do 1. experimentu, který proběhl na 3-barevné verzi Naica Crystal dPCR, byly zahrnuty celkem 3 vzorky DNA od 3 různých pacientů s diagnózou AML (AML1, AML2, AML3). Z nich u 2 byl známý typ resp. zastoupení bodové mutace *IDH1* v kodonu R132 na úrovni 4.5 % (typ R132H) resp. 46 % (typ R132L) (data z NGS), u vzorku AML3 nebyl mutační profil *IDH1* ani *IDH2* genu metodou NGS stanoven. Jednalo se o pacienta, který nevykazoval v době diagnózy žádný molekulární marker vhodný ke sledování zbytkové nemoci.

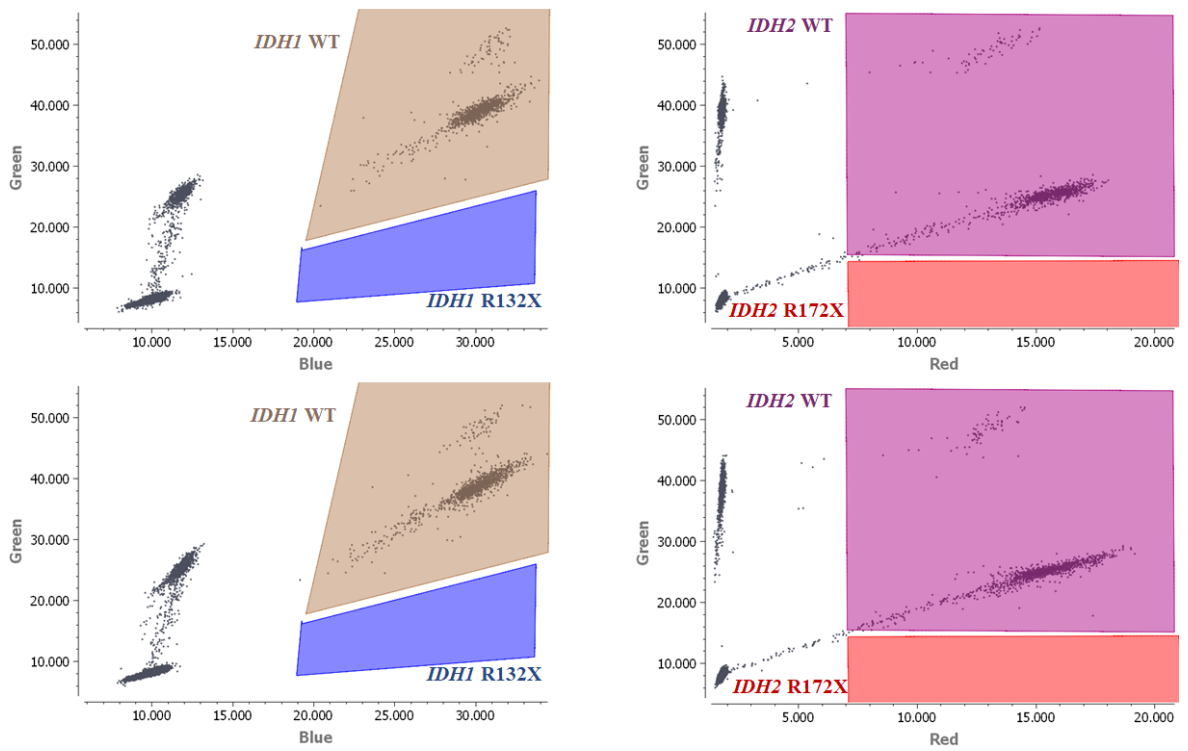
dPCR proběhla dle protokolu uvedeném v kapitole 4.3.3. Vstupním materiálem bylo 8.25 ng DNA (2500 kopií)/25 µl reakce. Po automatické kontrole kvality dropletů v softwaru Crystal Miner byly upraveny parametry snímání fluorescence v modrém kanálu (ze 100 ms na 50 ms), čas expozice v zeleném (160 ms) a červeném kanálu (50 ms) odpovídaly nastavení od výrobce. Ostrost obrazu, počet analyzovaných kapiček (>18 000) a počet saturovaných objektů po úpravě vyhovoval indikátorům kvality automaticky generovaným softwarem Crystal Miner. Populace byly definovány v 2D grafu pomocí mnohoúhelníkové prahové hodnoty (způsob polygonů) v souladu s doporučením výrobce kitu. Výsledky analýzy dat ve 2D grafu po definování vlastních populací ukazují Obr. 8-12.



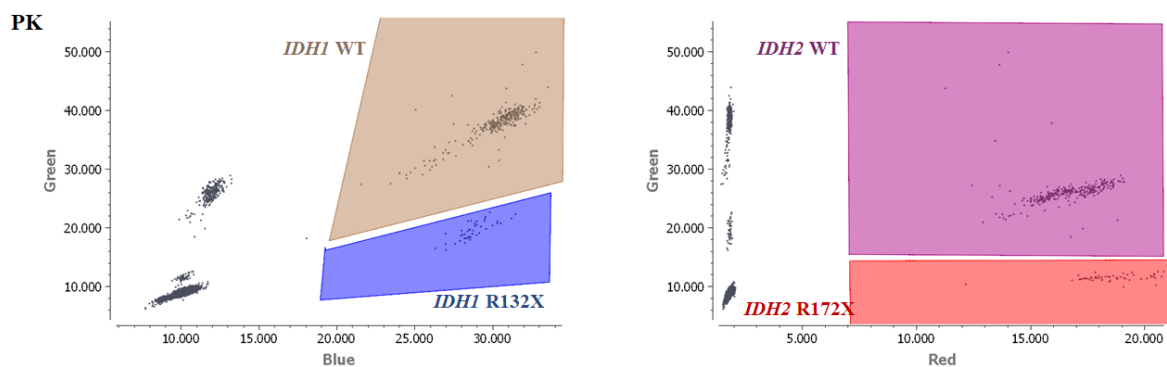
Obr. 8: Pacient AML1 (dublet). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *IDH1* R132X je detekována v modrém polygonu.



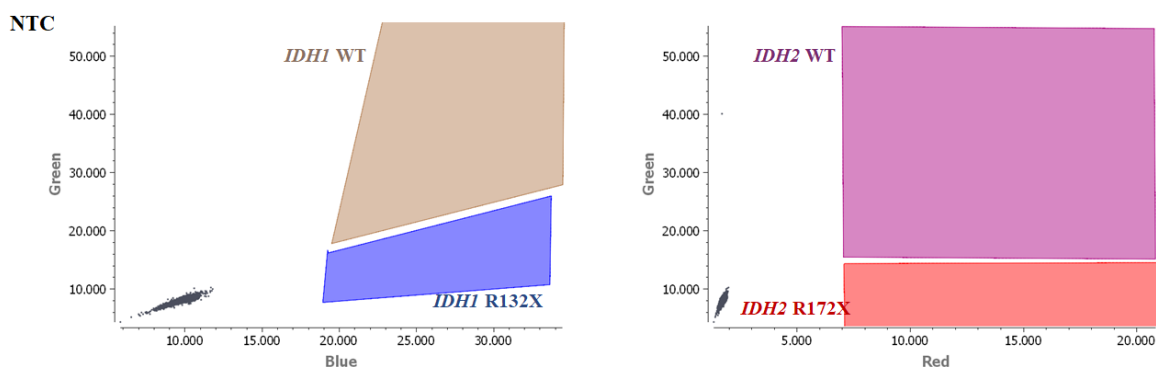
Obr. 9: Pacient AML2 (dublet). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *IDH1* R132X je detekována v modrém polygonu.



Obr. 10: Pacient AML3 (dublet). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *IDH1* R132X je detekována v modrém polygonu.



Obr. 11: Pozitivní kontrola (PK). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *IDH1* R132X je detekována v modrém polygonu.



Obr. 12: Non template control (NTC). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *IDH1* R132 je detekována v modrém polygonu.

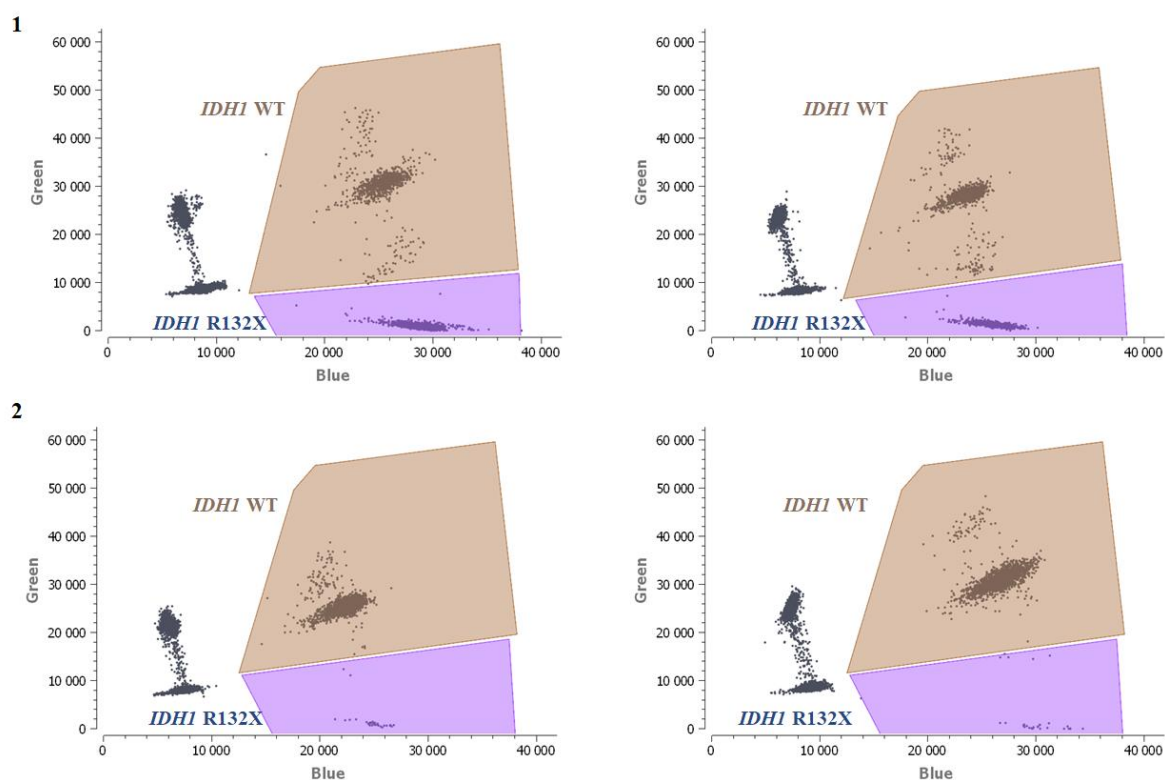
Vyhodnocení výsledků:

Kvalita získaných dat byla srovnána s očekávanými hodnotami intenzity fluorescence pozitivní kontroly deklarované výrobcem kitu (Tab. 2). V každém vzorku byl automaticky určen počet pozitivních dropletů pro jednotlivé genové mutace a na základě hodnoty Limit of Blank byl (dle počtu replikátů) vyhodnocen jako pozitivní/negativní. Získané výsledky v kopiích na μl resp. alelová nálož v % byly shrnuty v Tab. 12.

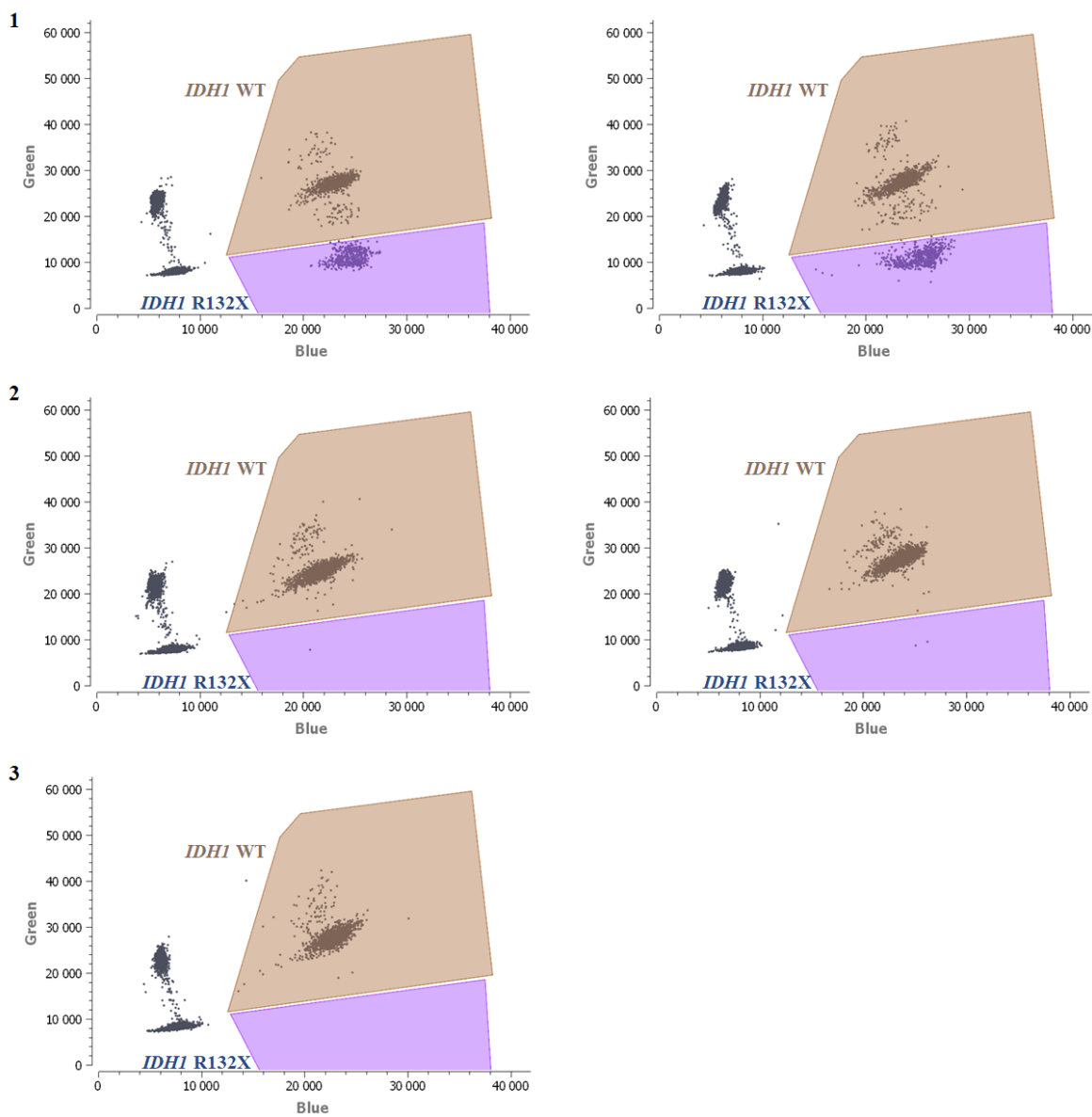
5.1.1.2. 6-barevná verze "Naica® system" Crystal Digital PCR™

V rámci experimentu na 6-barevné verzi Naica Crystal ddPCR proběhla analýza 2 pacientů (AML4, AML5) s AML z doby diagnózy. Současně byla provedena analýza 1 (AML4) resp. 2 (AML5) nezávislých navazujících odběrů získaných v průběhu klinického sledování (Tab. 12). Typ a zastoupení bodové mutace *IDHI* v kodonu R132 byl určen pomocí NGS.

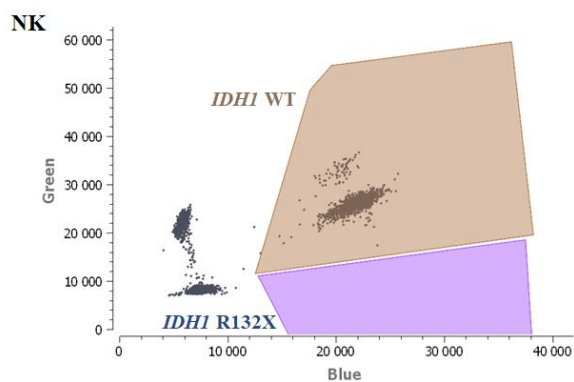
Provedení a podmínky experimentu se shodovaly s podmínkami ddPCR na 3-barevné verzi. Výsledky analýzy dat ve 2D grafu po definování vlastních populací ukazují Obr. 13-17.



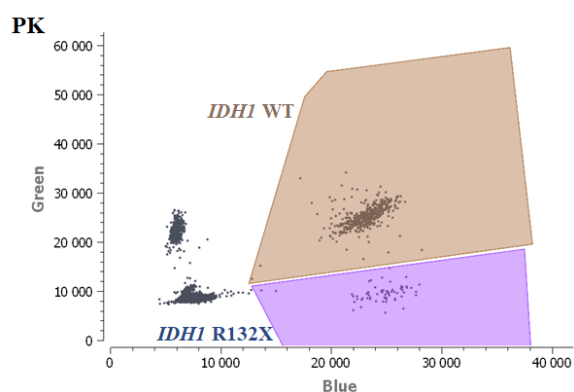
Obr. 13: Pacient AML4. 1 – odběr vzorku z doby stanovení diagnózy (dublet), 2 – navazující odběr (dublet). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů. Mutace *IDHI* R132 je detekována v modrém polygonu.



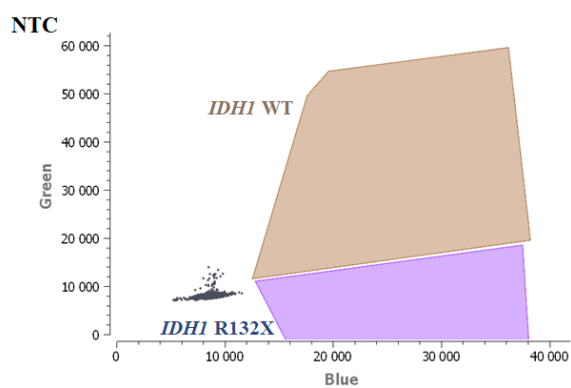
Obr. 14: Pacient AML5. 1 – odběr vzorku z doby stanovení diagnózy (doublet), 2 – navazující odběr (dublet), 3 – další navazující odběr. Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů. Mutace *IDHI* R132 je detekována v modrém polygonu.



Obr. 15: Negativní kontrola. Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů. Mutace *IDHI* R132 je detekována v modrém polygonu.



Obr. 16: Pozitivní kontrola. Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů. Mutace *IDHI* R132 je detekována v modrém polygonu.



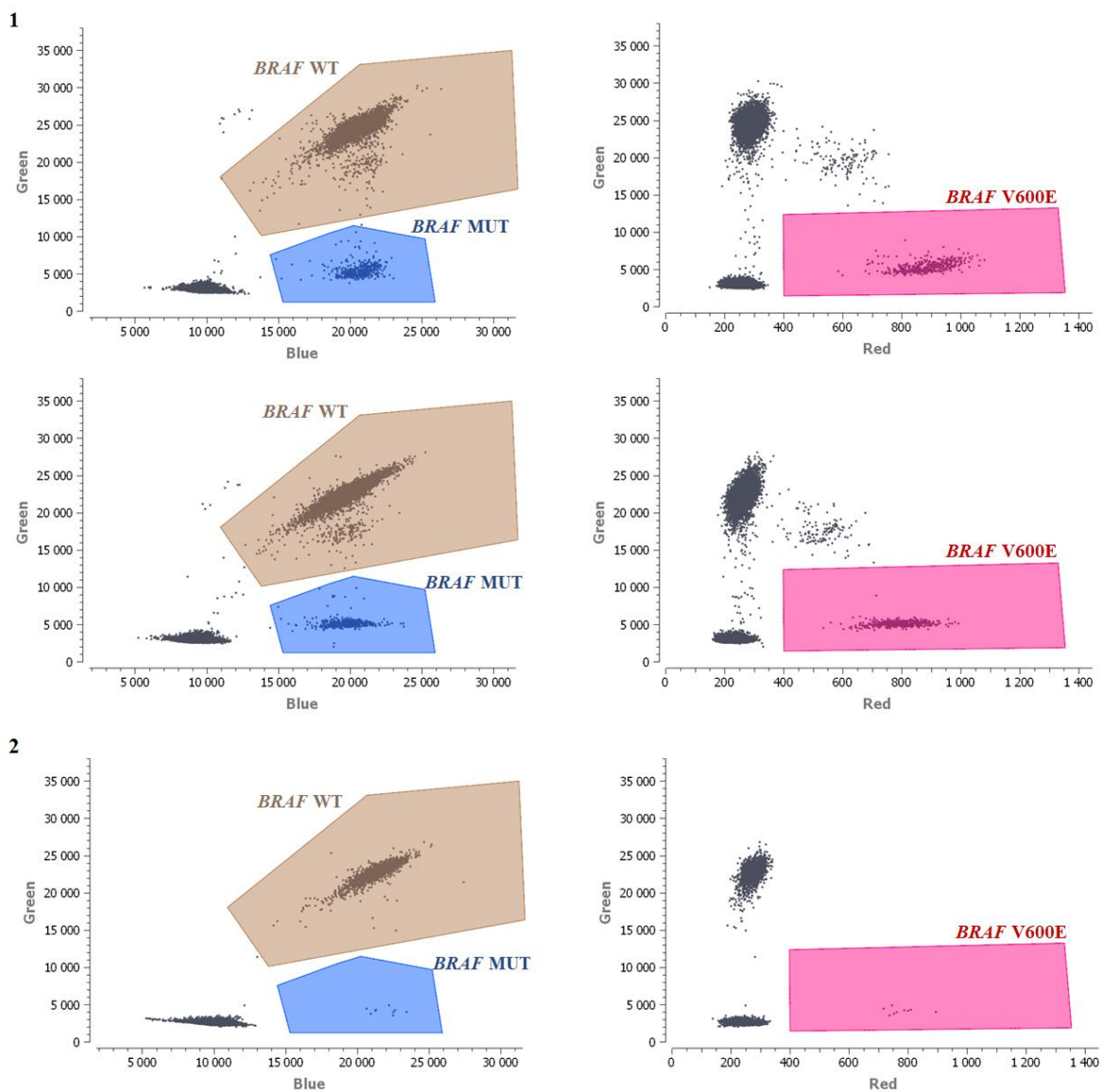
Obr. 17: Non template control (NTC). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů. Mutace *IDHI* R132 je detekována v modrém polygonu.

Na základě vybraných parametrů ddPCR (vstupní koncentrace DNA, nastavení parametrů analýzy dat) byl určen genotyp *IDH1* (pozitiv/negativ) v kodonu R132 ve všech analyzovaných vzorcích. Alelová nálož mutace *IDH1* R132 v analyzovaných vzorcích odpovídala datům z NGS (Tab. 12). Ani 1 vzorek, u kterého byla prokázána mutace R132X genu *IDH1*, nevykazoval dle výsledku ddPCR bodovou mutaci v pozici R172 genu *IDH2*. Ve vzorku o neznámém genotypu mutace *IDH1* ani *IDH2* genů prokázány nebyly. Doplněná sekvenční analýza 4. exonu *IDH1* resp. *IDH2* genu dle Sangerův žádné mutace v tomto vzorku neprokázala.

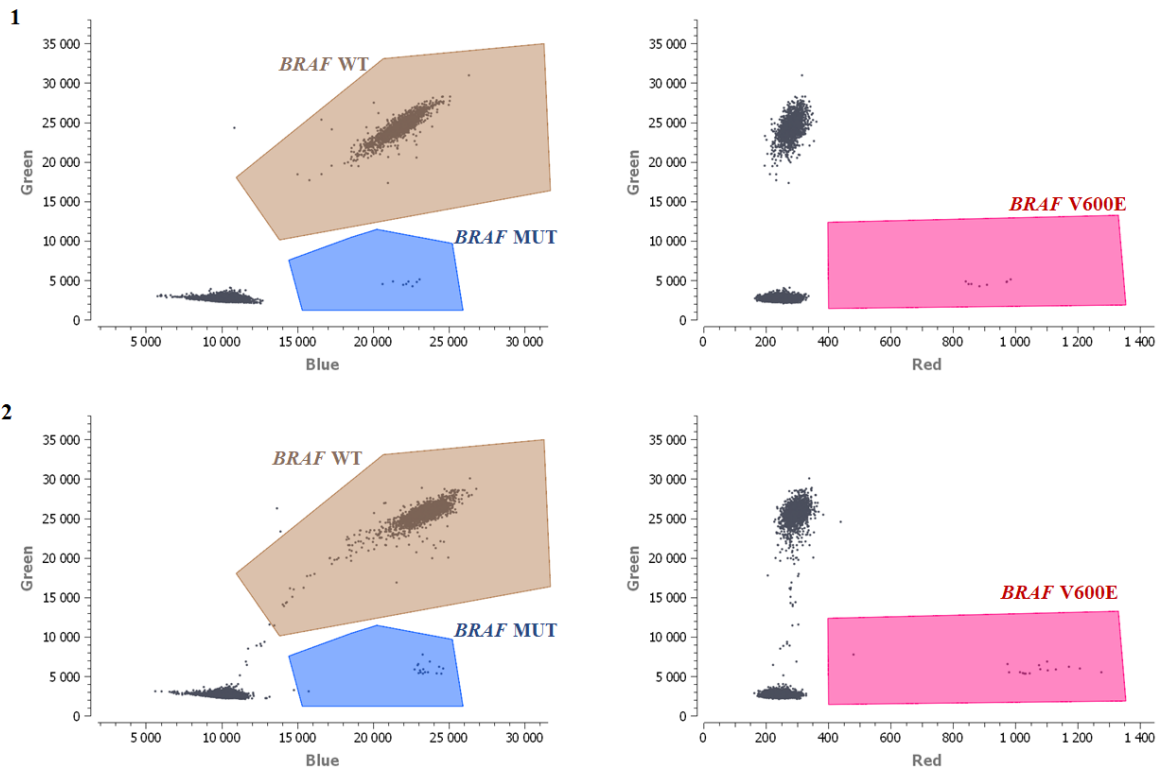
5.1.2. Detekce bodové mutace *BRAF* V600E pomocí komerčního kitu IDBRAF

V rámci experimentů na 6-barevné verzi Naica® system Crystal dPCR v LMB HOK FNOL byla provedena analýza mutace V600E genu *BRAF* u 2 pacientů s diagnózou vlasatobuněčná leukemie (HCL1, HCL2). Analyzovány byly vzorky z doby diagnózy a 1 další odběr u každého pacienta získaný v průběhu klinického sledování. dPCR proběhla dle protokolu uvedeném v kapitole 4.3.3. Parametry snímání fluorescence v modrém (100 ms), v zeleném (250 ms) a červeném (50 ms) kanálu odpovídaly doporučení výrobce. Ostrost obrazu, počet analyzovaných kapiček (> 18 000) a počet saturovaných objektů následně vyhovoval indikátorům kvality automaticky generovaným softwarem Crystal Miner.

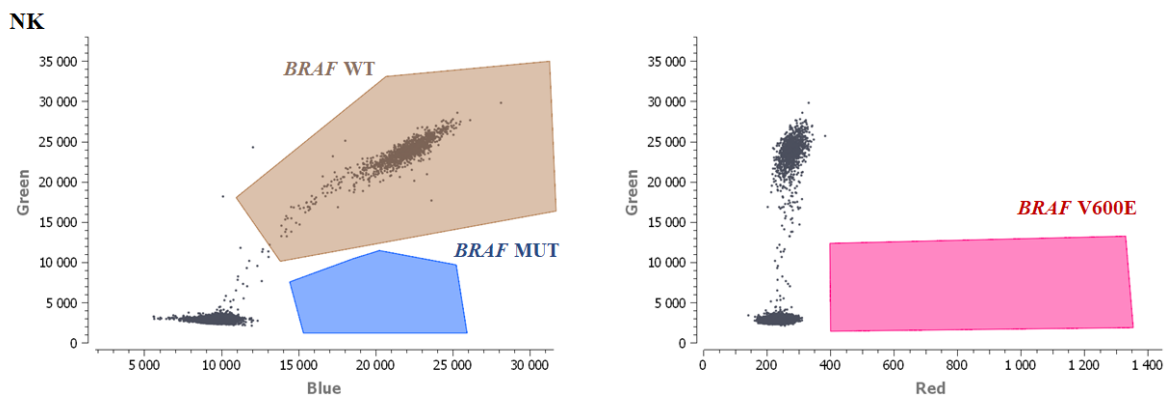
Populace byly definovány v 2D grafu pomocí mnohoúhelníkové prahové hodnoty (způsob polygonů) v souladu s doporučením výrobce kitu. Výsledky analýzy dat ve 2D grafu po definování vlastních populací ukazují Obr. 18-22. Procento *BRAF* V600E mutace bylo uvedeno v Tab. 12.



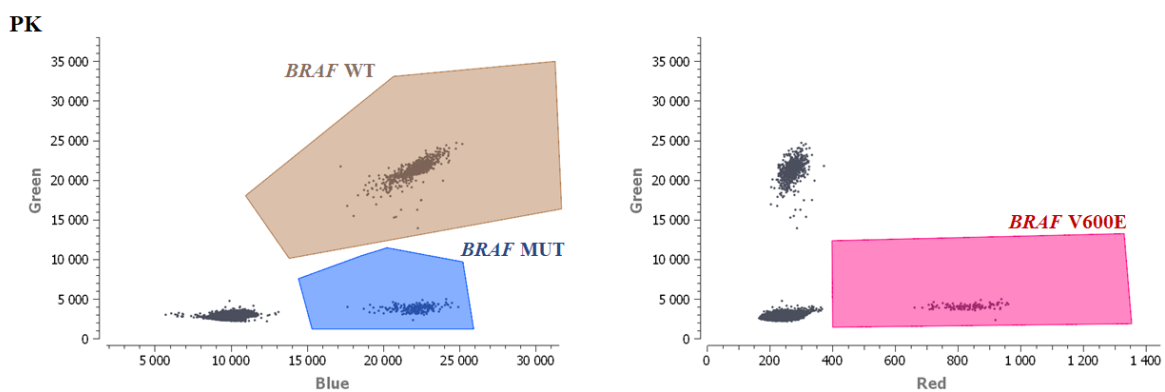
Obr. 18: Pacient HCL1. 1 – odběr vzorku z doby stanovení diagnózy (dublet), 2 – navazující odběr. Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *BRAF* V600E je detekována v červeném polygonu.



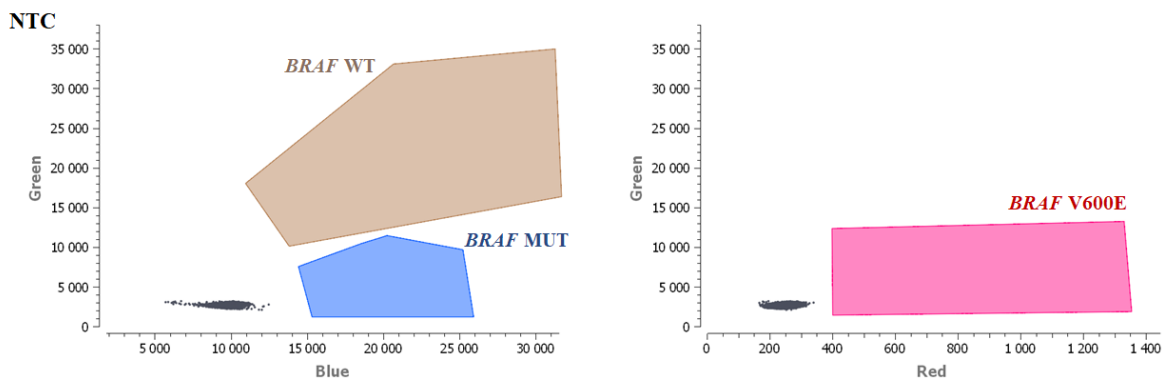
Obr. 19: Pacient HCL2. 1 – odběr vzorku z doby stanovení diagnózy, 2 – navazující odběr. Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *BRAF* V600E je detekována v červeném polygonu.



Obr. 20: Negativní kontrola. Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *BRAF* V600E je detekována v červeném polygonu.



Obr. 21: Pozitivní kontrola. Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *BRAF* V600E je detekována v červeném polygonu.



Obr. 22: Non template control (NTC). Modrý/Blue – intenzita fluorescence FAM cílů, Green/Zelený – intenzita fluorescence HEX cílů, Red/Červené – intenzita fluorescence Cy5 cílů. Mutace *BRAF* V600E je detekována v červeném polygonu.

Vyhodnocení výsledků:

Kvalita získaných dat byla srovnána s očekávanými hodnotami intenzity fluorescence pozitivní kontroly deklarované výrobcem kitu (Tab. 3). V každém vzorku byl automaticky určen počet pozitivních dropletů pro jednotlivé genové mutace a na základě hodnoty Limit of Blank byl (dle počtu replikátů) vyhodnocen jako pozitivní/negativní. Získané výsledky v kopiích na μl resp. alelová nálož v % byly shrnuty v Tab. 12.

Tab. 12: Výsledky analýzy pomocí "Naica® system" Crystal Digital PCR™. Ve vrchní části pacienti s AML, ve spodní s HCL.

Pacient	Datum odběru	Material	IDH1 WT C [cp/ml]	Pozitivní (počet)	IDH1 R132X C [cp/ml]	Pozitivní (počet)	Atelová nálož [%]	NGS	IDH2 WT C [cp/ml]	Pozitivní (počet)	IDH2 R172X C [cp/ml]	Pozitivní (počet)	Atelová nálož [%]
AML1	27.5.2020	KD	99.8	1427	4.35	64	5.1	4.5	87.3	1253	0	0	0
			96.9	1408	6.17	92		90	1311	0	0	0	0
AML2	6.8.2020	KD	54.7	776	45.8	652	44.6	46	101.2	1417	0	0	0
			59.4	912	46	709		96.6	1467	0	0	0	0
AML3	17.7.2019	KD	107.6	1150	0	0	0	n.a.	95.1	1020	0	0	0
			113.6	1299	0	0		97.6	1122	0	0	0	0
PK			28.2	301	4	43	12.4		26	278	5.02	54	16.2
NTC			0.08	1	0	0	0		0	0	0	0	0
AML4	3.11.2017	KD	54.6	951	47	820	44.7	46.6					
			58.9	1023	44.6	779							
AML4	15.12.2017	KD	93.3	1589	1.65	29	1.6	2					
			98.4	1723	1.55	28							
AML5	14.8.2013	PK	54.9	808	30.1	446	35.5	36					
			60.2	1001	33.4	560							
AML5	20.9.2013	PK	95.8	1523	0.06	1	0.1	n.a.					
			95.6	1472	0.13	2							
NK	13.6.2014	KD	83.4	1332	0	0	0	0					
			86.5	1438	0	0			n.a.				
PK			33	452	4.57	63	12.2						
NTC			0	0	0	0	0						
HCL1	2.8.2011	PK (MNC)	466	7401	20.6	375	4.1						
			525	7715	22	377							
HCL1	2.4.2012	PK (MNC)	86.8	1495	0.51	9	0.6						
			90.3	1439	0.49	8	0.5						
HCL2	23.5.2013	KD (MNC)	98.3	1676	0.91	16	0.9						
			71.5	1185	0	0	0.0						
PK			43	719	7.28	123	14.5						
NTC			0	0	0	0	0						

5.2. Detekce vybraných bodových mutací na platformě QIAcuity Four dPCR system (QIAGEN)

V rámci experimentů na platformě QIAcuity Four dPCR system byly optimalizovány celkem 2 dPCR metodiky zaměřené na detekci bodové mutace D816V genu *c-KIT* a V600E genu *BRAF*.

5.2.1. Optimalizace podmínek dPCR

Složení reakční směsi (koncentrace primerů a sond) a teplotně/časový profil dPCR vycházel z protokolu, který byl optimalizován pro kvantifikaci vybraných cílů na úrovni DNA/cDNA (pro analýzy na úrovni RNA) pomocí QIAcuity Probe PCR kit (Qiagen) (kapitola 4.3.4.).

Na základě získaných výsledků bylo potřebné určit optimální podmínky dPCR v podmínkách LMB HOK FNOL.

Cílem experimentů zaměřených na optimalizaci podmínek dPCR bylo dosáhnout dobrou oddělitelnost mezi pozitivními a negativními kapičkami a minimalizovat nespecifické kapičky (tzv. "děšť", co jsou pozitivní kapičky, které jsou na základě intenzity lokalizovány mezi negativní a pozitivní populací) (Obr. 25).

V rámci nastavování reakčních podmínek byla testována optimální koncentrace vstupní DNA (5 – 10 – 20 – 40 – 60 – 80 ng) do reakce, vliv štěpení DNA restrikčním enzymem (0 – 2U enzymu na reakci), vliv délky annealingu/extenze a počtu cyklů (40 resp. 42) v rámci PCR amplifikace. Na základě získaných výsledků bylo vybráno optimální složení reakční směsi a podmínky PCR amplifikace – Tab. 13-15.

Tab. 13: Složení reakční směsi pro detekci bodových mutací *c-KIT* D816V a *BRAF* V600E na platformě QIAcuity Four dPCR systém. Pár primerů a sond (MUT/WT) se mění dle typu detekované genové mutace.

Komponenta	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem na 1 vzorek [μl]
4x Probe PCR Master Mix	4x	1x	10
forward primer	8 μM	0.8 μM	4
reverse primer	8 μM	0.8 μM	4
sonda MUT (FAM)	4 μM	0.4 μM	4
sonda WT (HEX)	4 μM	0.4 μM	4
Eco RV	1U/μl	2U/reakce	2
voda (RNase-free)			do 40
templátová DNA		10-20 ng/R*	dle optimální koncentrace
Celkový reakční objem			40

Tab. 14: Teplotně/časový profil dPCR pro detekci bodové mutace *c-KIT* D816V na platformě QIAcuity Four dPCR systém.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Hot-start aktivace	95	2 min	
Denaturace	95	15 s	40
Annealing/extension (kombinace)	60	30 s	

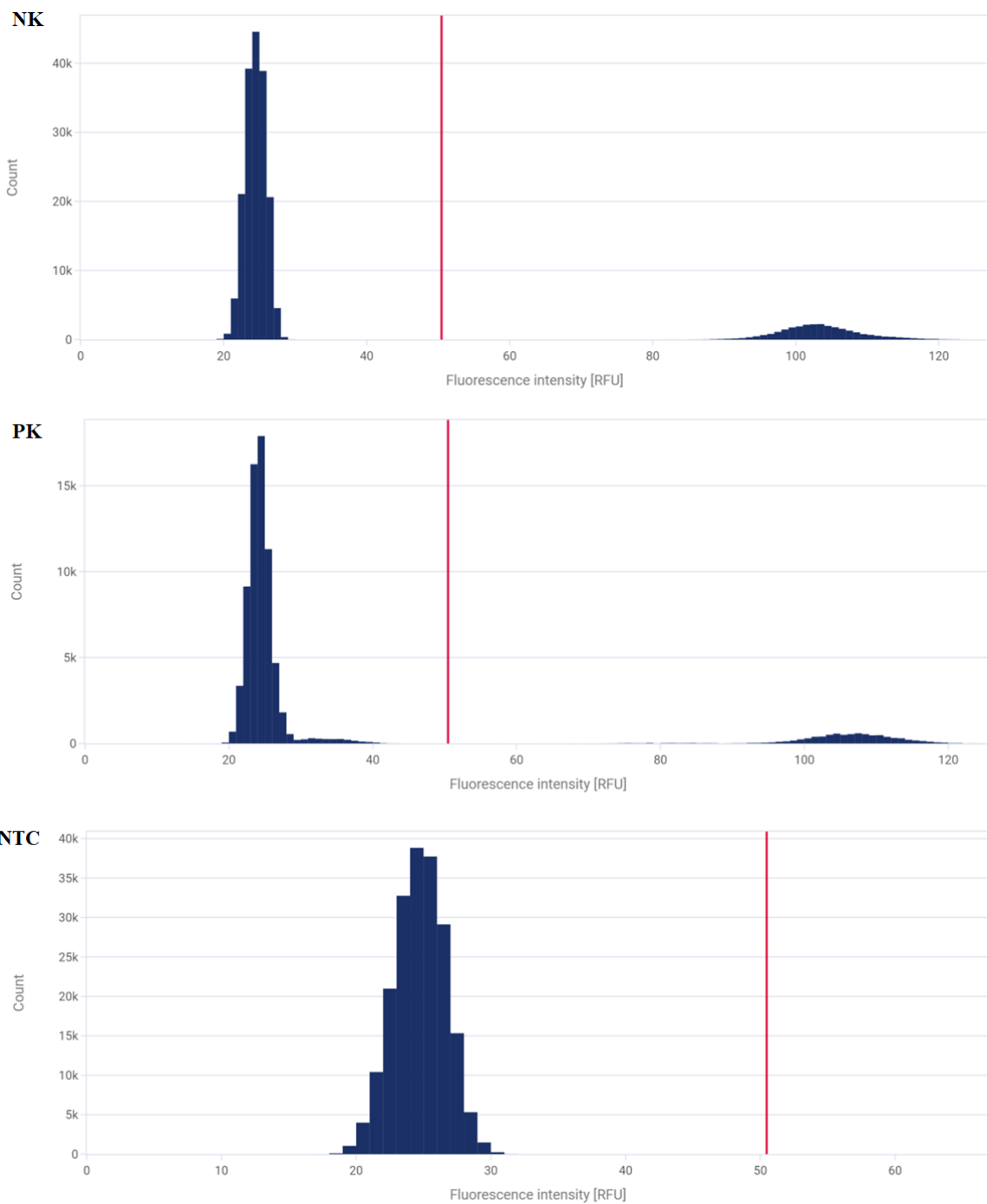
Tab. 15: Teplotně/časový profil dPCR pro detekci bodové mutace *BRAF* V600E na platformě QIAcuity Four dPCR systém.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Hot-start aktivace	95	10 min	
Denaturace	94	30 s	40
Annealing/extension (kombinace)	58	1 min	

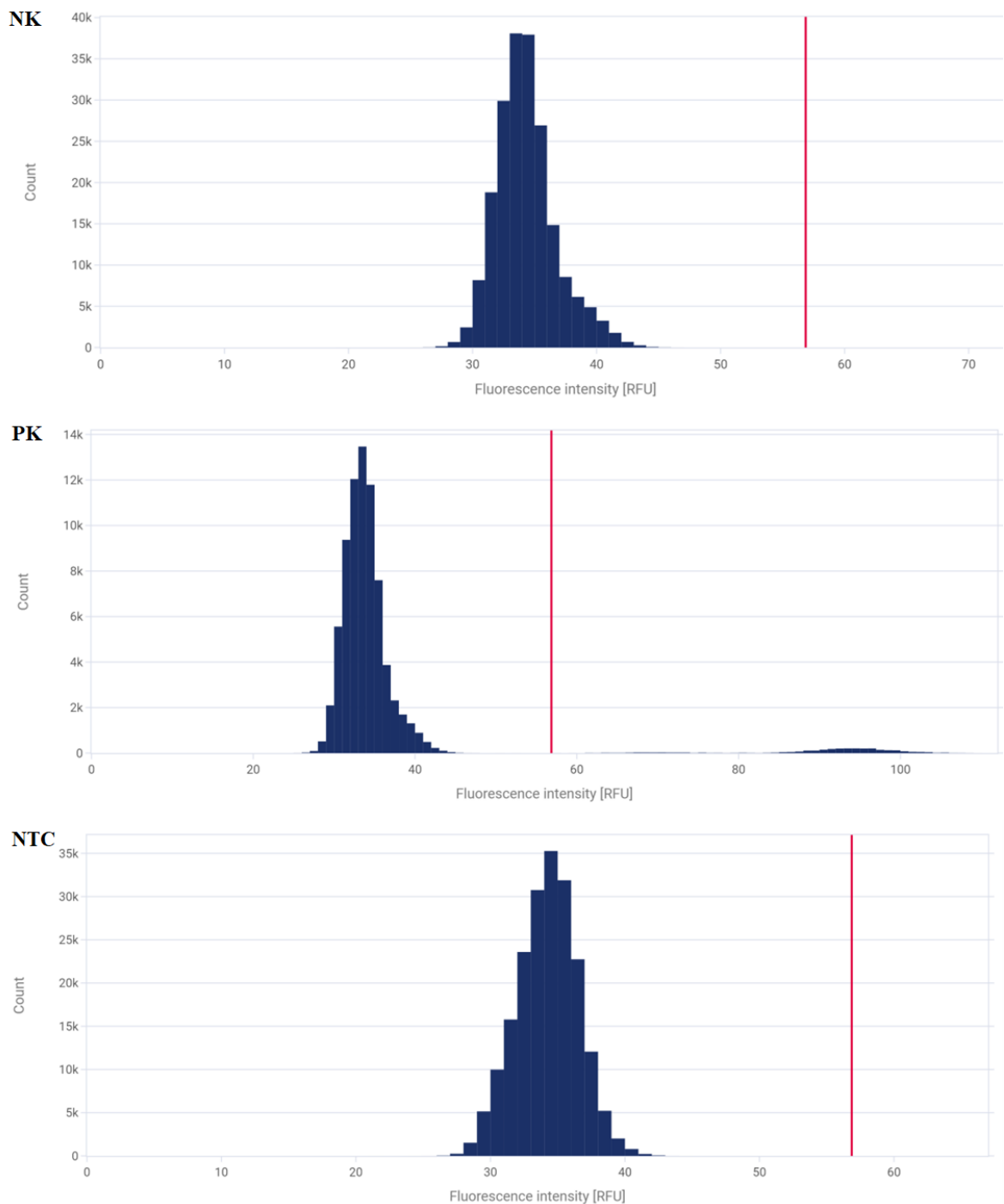
Definice populací, nastavení prahu fluorescence pro cílové molekuly v detekčních kanálech (FAM/HEX):

Náhled na histogramy je užitečný pro vyhodnocení oddělitelnosti mezi negativní populací (levá strana 1D histogramu) a pozitivní populací (pravá strana 1D histogramu), umožňuje zkontrolovat nebo upravit prahy fluorescence. Obr. 23-25 ukazují 1D a 2D histogramy získané na základě analýzy mutace D816V genu *c-KIT* u NK, PK a NTC v cílových kanálech.

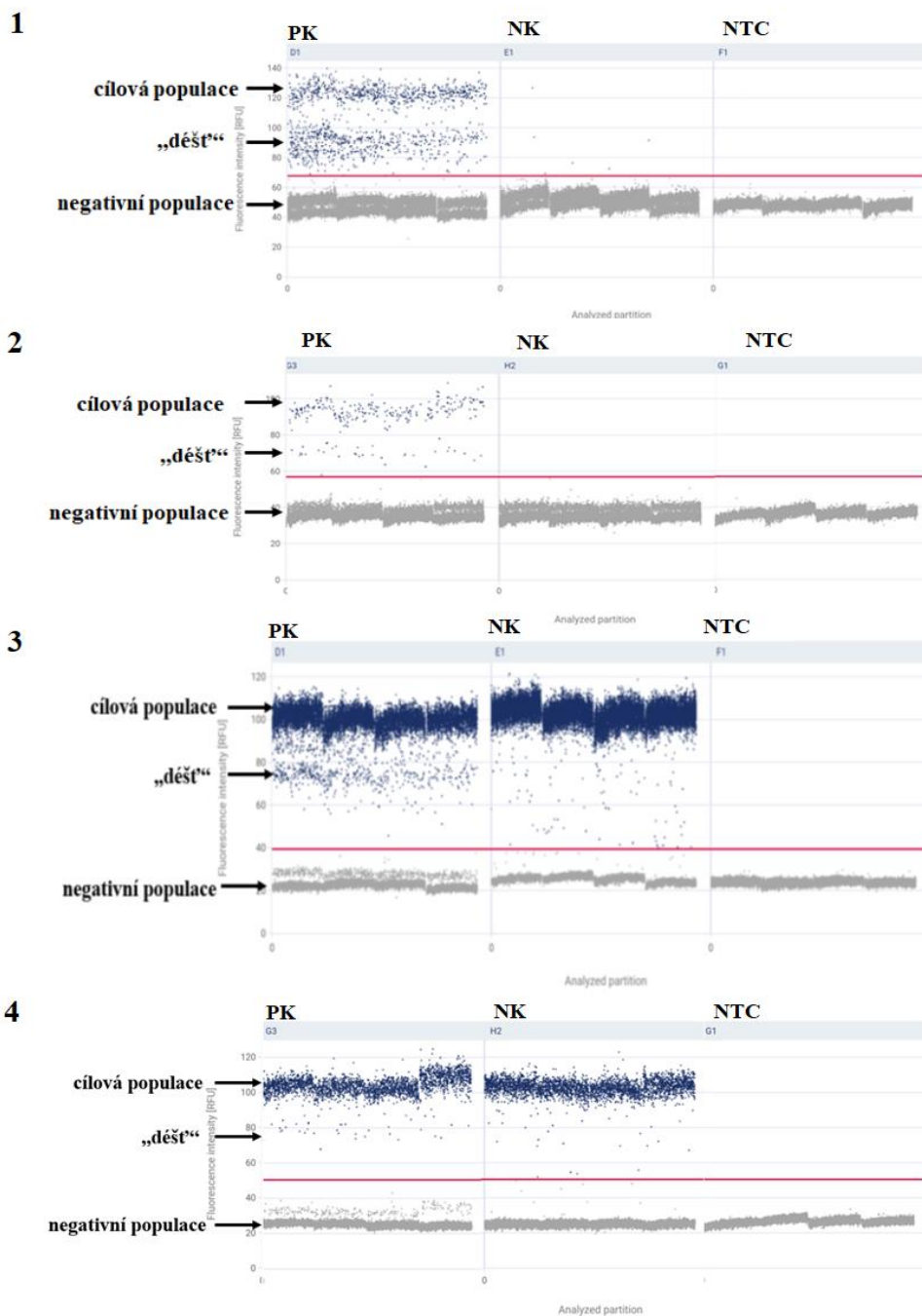
Obdobným postupem byl nastaven práh fluorescence i pro detekci mutace *BRAF* V600E (data neuvedena).



Obr. 23: Histogramy znázorňující fluorescenci HEX cílů (žlutý kanál, *wild type* alela) při detekci bodové mutace D816V genu *c-KIT* u NK (pouze *wild-type* alela), PK a NTC. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek s heterozygotním genotypem v kodonu D816 genu *c-KIT* (zastoupeny jsou obě alely). NTC (slepý vzorek) nevykazuje fluorescenci HEX cílů.



Obr. 24: Histogramy znázorňující fluorescenci FAM cílů (zelený kanál, D816V alela) při detekci bodové mutace D816V genu *c-KIT* u NK (bez fluorescence), PK a NTC. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek s heterozygotním genotypem v kodonu D816 genu *c-KIT* (zastoupeny jsou obě alely). NTC (slepý vzorek) nevykazuje fluorescenci HEX cílů.



Obr. 25: 2D Histogramy znázorňující fluorescenci ve FAM (část 1, 2) a HEX (část 3, 4) kanálu u PK, NK a NTC při detekci bodové mutace D816V genu *c-KIT*. Grafy znázorňují oddělitelnost populací v závislosti na množství vstupní DNA při úvodním experimentu s 80 ng (část 1, 3) a v optimálních podmínkách s 20 ng DNA (část 2, 4). Dle 2D plotů byl nastaven práh fluorescence pro FAM cíl (D816V) na úrovni 120 RFU, resp. pro HEX cíl (wild type alela) na úrovni 100.

Stanovení false positive rate (FPR):

Po určení optimálních podmínek dPCR byla v rámci experimentů stanovena míra falešně pozitivních kapiček. Výsledky byly získány na základě amplifikace vzorku DNA zdravého dárce (*wild-type* vzorek) v 8 nezávislých jamkách (celkem 8 replikátů). Získané výsledky sumarizuje Tab 16.

Tab. 16: Počet kopií falešně pozitivních cílů ve vzorků se 100% *wild type* alelou pro jednotlivé mutace.

Vzorek č.	D816V (<i>c-KIT</i>)			V600E (<i>BRAF</i>)		
	c [kopie/ μ l]	reakční oddíly		c [kopie/ μ l]	reakční oddíly	
		+	-		+	-
1	0	0	25419	0.104	2	25447
2	0	0	25465	0	0	25449
3	0	0	25464	0	0	25473
4	0	0	25461	0	0	25463
5	0	0	25443	0.055	1	25372
6	0	0	25444	0	0	25467
7	0	0	25471	0	0	25457
8	0	0	25461	0.053	1	25417

5.2.2. Detekce sledovaných bodových mutací u vybraných pacientů

Dizajn experimentu:

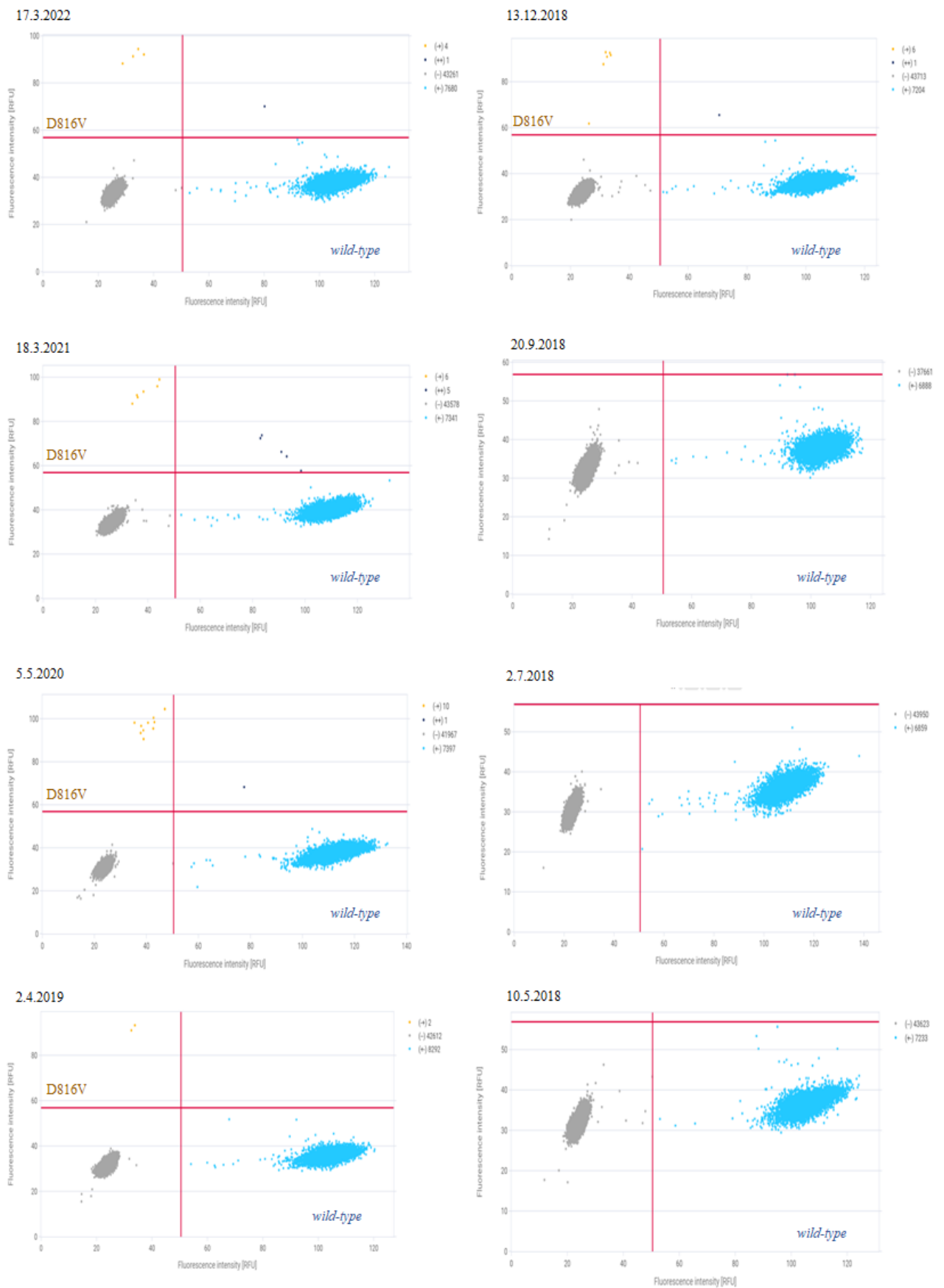
V každém experimentu byl analyzován slepý vzorek (voda místo DNA) alespoň v 1 pozici, *wild-type* vzorek (slouží k monitorování falešné positivity) a pozitivní kontrola (slouží k nastavení prahu fluorescence). Vzorky DNA byly vyšetřovány v duplikátech.

Pacientovi (M, 1960) byla diagnostikována systémová mastocytóza (postižení KD, kůže a jater s rozvojem ascitu), molekulární analýza provedena v LMB HOK FNOL pomocí alelově specifické PCR prokázala mutaci D816V genu *c-KIT* (výsledek byl potvrzen metodou Sangerova sekvenování). Od 7/2017 do 30.1.2018 byla pacientovi aplikována terapie cladribinem, která vedla k regresi ascitu, vymizení B symptomů a postupnému vzestupu hladin hemoglobinu. Pacient podstoupil v srpnu 2018 léčbu alogenní transplantací krvetvorných kmenových buněk, v 12/2018 u něho došlo k odvržení štěpu a obnovení vlastní (autologní krvetvorby) bez klinických projevů základní choroby (systémové mastocytózy). Aktuálně je pacient hematologicky stabilizován, bez zjevné progresse nebo projevu mastocytózy, ale molekulární marker onemocnění (mutace D816V genu *c-KIT*) je na základě analýzy DNA metodou AS-PCR dlouhodobě pozitivní. Pacient je aktuálně hematologicky

sledován, pravidelně se u něj kontroluje výskyt mutace D816V genu *c-KIT* a hladina buněčného chimerismu.

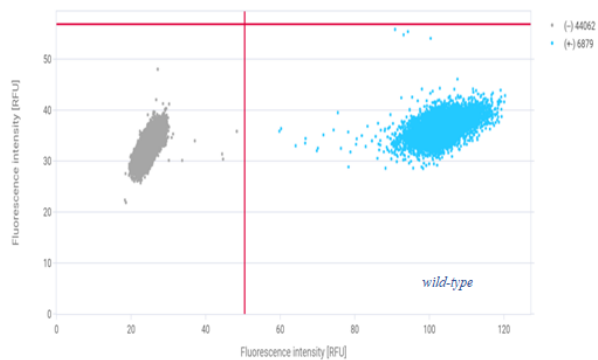
V rámci experimentu bylo u pacienta (M, 1960) vyšetřeno celkem 11 vzorků, které byly odebrány z doby diagnózy a následně v různých časech v průběhu monitorování klinického stavu (Tab. 17). Vzorky byly podrobeny stanovení mutace D816V genu *c-KIT* metodou dPCR. Získané výsledky sumarizuje Tab. 17. Výsledky analýzy dat ve 2D grafu po definování vlastních populací ukazují Obr. 26 a 27. Alelová nálož mutace D816V v pozitivních odběrech byla uvedena v Tab 17.

Z důvodu revize výsledků byla provedena retrospektivní analýza celkem 14 vzorků pacienta z doby diagnózy a následného *follow up* metodou alelově specifické PCR (Obr. 28 a 29). Získané výsledky sumarizuje Tab. 17.



Obr. 26: 2D bloty znázorňující detekci mutace D816V genu *c-KIT* u pacienta se SM. Osa x – intenzita fluorescence (RFU) HEX cílů (*wild-type*), osa y – intenzita fluorescence (RFU) FAM cílů (alela D816V).

26.4.2018



NK



16.10.2017



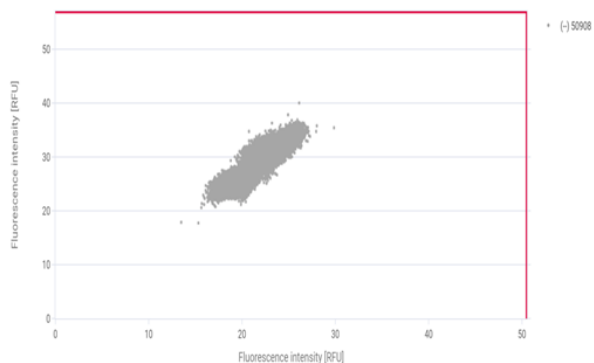
PK



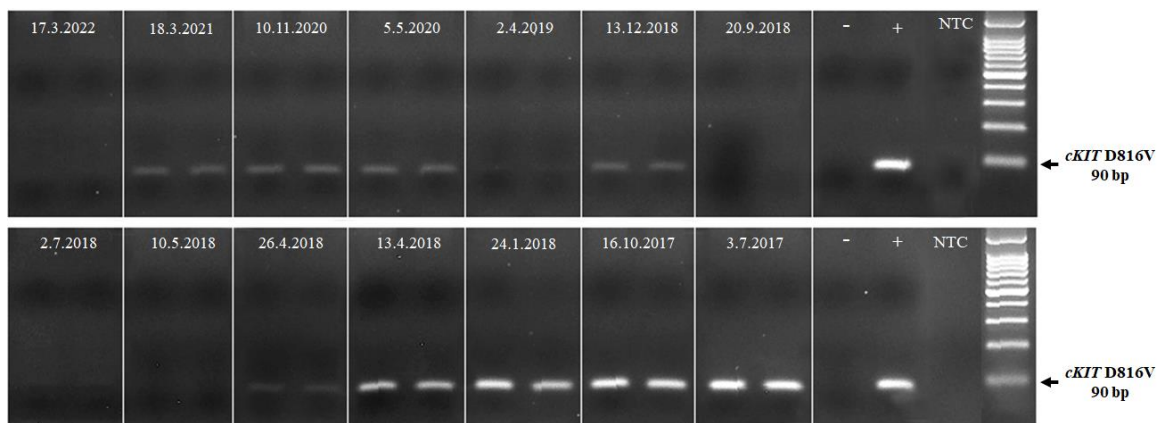
3.7.2017



NTC

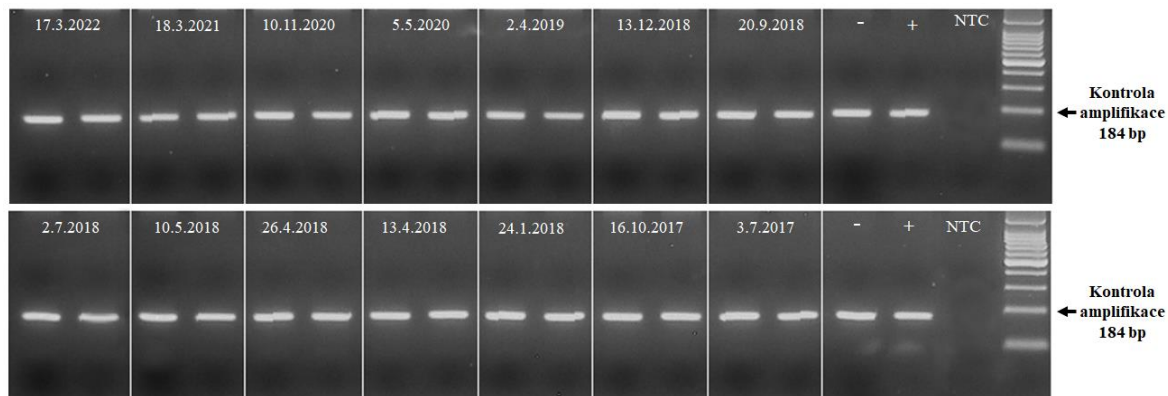


Obr. 27: 2D bloty znázorňující detekci mutace D816V genu *c-KIT* u pacienta se SM. Osa x – intenzita fluorescence (RFU) HEX cílů (*wild-type*), osa y – intenzita fluorescence (RFU) FAM cílů (alela D816V).



Obr. 28: Detekce mutantní alely (PCR produkt 90 bp) D816V genu *c-KIT* pomocí AS-PCR.

- negativní kontrola, + pozitivní kontrola, NTC – slepý vzorek



Obr. 29: Kontrola amplifikace (PCR produkt 184 bp) během detekce mutace D816V genu *c-KIT* pomocí AS-PCR.

- negativní kontrola, + pozitivní kontrola, NTC – slepý vzorek

Tab. 17: Výsledky analýzy mutace D816V *cKIT* u pacienta v době diagnózy SM (7/2017, odběr 14) a v dalších navazujících odběrech (1-13) metodou dPCR srovnán s výsledky analýzy mutace D816V pomocí AS-PCR. Poslední sloupec uvádí podíl dárcovské krvetvorby monitorovaný v po-transplantačním období (od 4/2018). A – ano, N – ne, n.a. – neanalyzováno, nh – nelze hodnotit, WT – wild-type, PK – periferní krev, KD – kostní dřeň

odběr	datum odběru	materiál	pozitivní (A/N)	dPCR			AS-PCR pozitivní	podíl dárcovské krvetvorby [%]
				WT pozitivní (počet)	D816V pozitivní (počet)	alelová nálož [%]		
1	17.03.2022	PK	A	7680	4	0.05	A/N	28
2	18.03.2021	PK	A	7341	6	0.08	N	28
3	10.11.2020	PK	n.a.	-	-	-	A	29
4	05.05.2020	PK	A	7397	10	0.14	A	31
5	02.04.2019	KD	A	8292	2	0.02	A	5
6	13.12.2018	PK	A	7204	6	0.08	nh	41
7	20.09.2018	PK	N	6888	0	0,0	A	85
8	02.07.2018	KD	N	6859	0	0,0	N	79
9	10.05.2018	PK	N	7233	0	0,0	N	100
10	26.04.2018	KD	N	6879	0	0,0	N	98
11	13.04.2018	PK	n.a.	-	-	-	A	92
12	24.01.2018	KD	n.a.	-	-	-	A	-
13	16.10.2017	PK	A	8285	1930	19	A	-
14	03.07.2017	PK	A	5485	1651	23	A	-

Pacientovi HCL1 (Ž, 1946) byla v 10/2004 diagnostikována HCL, pacient byl dlouhodobě pozorován bez terapie, v 6/2011 byla u pacienta diagnostikována chronická lymfocytární leukemie, od 4/2012 byla zahájena terapie pro progredující neutropenii, anemizaci, noční pocení; v 8/2018 došlo k progresi CLL, vyšetření kostní dřeně neprokázalo známky HCL, ale potvrdilo významné postižení KD buňkami CLL na úrovni 60 %. Výsledky analýzy mutace *BRAF* V600E u pacienta HCL1 pomocí dPCR na platformě QIAcuity byly uvedeny v Tab. 18. Výsledky analýzy mutace *BRAF* V600E u pacienta HCL1 pomocí komerčního kitu IDBRAF (ID Solutions) byly uvedeny v Tab. 12.

Pacient HCL2 (M, 1948) je sledován v ambulanci HOK pro dg HCL (Dg 11/2012), bez klinické intervence, monitorování MRD probíhá na úrovni imunofenotypizace (12/2012 byla detekována MRD na úrovni 0.5 %). Výsledky analýzy mutace *BRAF* V600E na systému QIAcuity byl uveden v Tab. 18. Výsledky paralelní analýzy mutace *BRAF* V600E u pacienta HCL1 pomocí komerčního kitu IDBRAF (ID Solutions) byl uveden v Tab. 12.

Tab. 18: Výsledky analýzy mutace *BRAF* V606V u pacientů HCL1 (analyzovány 2 nezávislé odběry, vždy v dubletu) a HCL2 (analyzován 1 odběr, v dubletu) metodou dPCR na systému QIAcuity. Výsledky duplicitních analýz byly sloučeny a analyzovány jako celek.

A – ano, PK – periferní krev, MNC – mononukleární buňky

Pacient	odběr	datum odběru	materiál	pozitivní (A/N)	dPCR <i>BRAF</i> V600E			AS-PCR pozitivní (A/N)
					WT pozitivní (počet)	V600E pozitivní (počet)	alelová nálož (%)	
HCL1	1	2.8.2011	PK-MNC	A	34656	747	2.11	A
HCL1	2	2.4.2012	PK-MNC	A	47115	28	0.06	A
HCL2	2	16.9.2021	PK-MNC	A	46828	11	0.02	A
NK					188762	0	0	
PK					48014	428	0.88	
NTC					203428	0	0	

6 DISKUZE

Jako nová generace kvantitativní PCR představuje digitální PCR vysoce citlivou, specifickou a přesnou techniku, která díky detekčnímu limitu mezi 10^{-4} a 10^{-5} nabízí široké možnosti uplatnění od měření genové exprese (bez potřeby standardní křivky nebo plasmidů) až po detekci bodových mutací (jednotlivě nebo několik různých variant najednou díky multiplexním systémům) na základě analýzy jak RNA (cDNA) tak genomické DNA izolované nejen z periferní krve nebo kostní dřeně, ale také z volné nádorové DNA nebo FFPE tkání (Quan *et al.*, 2018; Cilloni *et al.*, 2019).

V oblasti diagnostiky hematologických onemocnění byla popsána řada systémů na principu dPCR, které umožňují například kvantifikovat mutace genu *NPM1* u akutních leukemií, monitorovat hladiny transkriptu *BCR/ABL* u Ph (Philadelphia chromosome) pozitivních leukemií, detekovat mutace *BCR-ABL1*, které odpovídají za neuspokojivou odpověď nebo selhání léčby inhibitorů tyrozinkináz u pacientů s chronickou myeloidní leukemií, detekovat mutace genů *JAK2* a *CALR*, které představují diagnostické markery chronických myeloproliferativních onemocnění nebo monitorovat léčebnou odpověď u pacientů, kteří podstoupili léčbu alogenní transplantací krvetvorných kmenových buněk nebo novou generaci imunoterapie modifikovanými T lymfocyty, u kterých se vyžaduje přesná a vysoce citlivá kvantifikace buněčného chimerismu resp. je potřebné efektivně monitorovat hladiny T lymfocytů s chimerickým antigenním receptorem (CAR-T) (Cilloni *et al.*, 2019; Galimberti *et al.*, 2022).

V této práci jsme se zaměřily na vybrané bodové mutace genů *c-KIT*, *BRAF* a *IDH1*, které asociují s patogenezí systémové mastocytózy, vlasatobuněčné leukemie resp. akutní myeloidní leukemie.

V posledních letech došlo díky pokročilým technologiím molekulární analýzy k významnému zlepšení molekulární charakterizace a léčby pacientů se systémovou mastocytózou (SM). Aplikace vysoce citlivých a přesných technik při detekci a kvantifikaci mutace *KIT D816V* umožňuje volit neinvazivní testování na základě analýzy periferní krve a hodnotit odpověď na léčbu dle monitorování hladiny alelové nálože. Pokročilá genetická analýza genu *KIT* společně s identifikací přidružených genových mutací pomocí NGS umožnily rozdělit pacienty do 3 podskupin s odlišnou patogenezí a prognózou – pacienti s nálezem *KIT D816V* vázaným pouze na mastocyty, pacienti s multiliniovou distribucí *KIT D816V* a pacienti s "multi" mutovaným onemocněním. Na základě kombinace klinických a molekulárních dat byly vytvořeny nové prognostické skórovací systémy (Martelli *et al.*, 2020).

V této diplomové práci byla navržena a optimalizována metoda detekce mutace *c-KIT* D816V pomocí dPCR na principu alelově specifické amplifikace pomocí TaqMan sond. Pomocí dPCR bylo provedeno retrospektivní monitorování alelové nálože D816V mutace u pacienta s diagnózou SM, který podstoupil léčbu aloTKB. Mutace D816V byla vyšetřena v době diagnózy z periferní krve a v dalších 10 navazujících odběrech periferní krve nebo kostní dřeně (Tab. 17). Dle výsledků dPCR byla alelová nálož D816V v době stanovení diagnózy 23 %, v dalším odběru byla hladina D816V stabilní (19 %). Následujících 9 vyšetřených vzorků bylo odebráno v různých časových intervalech od provedení aloTKB. Alelová nálož D816V stanovená pomocí dPCR se v těchto vzorcích pohybovala mezi 0.02-0.14 %. V po-transplantačním období byla mutace D816V zachycena pomocí dPCR poprvé v odběru, který vykazoval 41 % dárcovské krvetvorby (došlo k odhojení štěpu). Je zajímavé, že v dalším navazujícím odběru KD, ve kterém došlo k poklesu alogenní krvetvorby na 5 %, mutace D816V pomocí dPCR prokázána nebyla. V dalších 3 odběrech PK, ve kterých byla dárcovská krvetvorba na úrovni 31 %, 28 % resp. 28 %, bylo prokázáno 0.14 %, 0.08 % resp. 0.05 % D816V alel. Paralelně byla provedena analýza mutace D816V pomocí alelově specifické PCR, která se dosud používala v rámci rutinní laboratorní diagnostiky k detekci *c-KIT* D816V mutace v LMB HOK FNOL ve všech dostupných vzorcích DNA, celkem bylo vyšetřeno 14 vzorků (Obr. 28 a 29). Výsledky párové analýzy pomocí dPCR a AS-PCR byly dostupné u 11 vzorků (Tab. 17). V 8 případech se výsledky dPCR a AS-PCR shodovaly. Ve zbývajících 3 případech byla mutace D816V detekována pouze pomocí dPCR (2 případy, resp. 1 analýza pomocí AS-PCR byla na hranici detekce metody a nebyla zařazena do hodnocení) nebo byla určena pouze metodou AS-PCR. Nesoulady mezi srovnávanými metodami mohly vzniknout na různých úrovních, je vysoce pravděpodobné, že vlivem nízké alelové nálože se do analýz (dPCR, resp AS-PCR) nedostalo dostatek templátu s mutací D816V. Tento artefakt dokáže dPCR překlenout analýzou vzorků v multiplikátech (triplikáty až tetraplikáty), kdy lze jednotlivé analýzy sloučit, zvýšit citlivost detekce a efektivně kvantifikovat alelovou nálož i minoritních alel.

Řada studií dlouhodobě upozorňuje na prognostický význam alelové nálože D816V u SM (Erben *et al.*, 2014; Hoermann *et al.*, 2014). Dle recentní studie Greinera *et al.* představuje stanovení alelové nálože D816V mutace pomocí dPCR nový biomarker s nezávislou prognostickou hodnotou, který lze využít k monitorování progresu onemocnění a odpovědi na léčbu u SM (Greiner *et al.*, 2020). Do budoucna lze očekávat další důraz na přesnou a citlivou detekci mutace D816V u SM díky novým inhibitorům tyrosinkinázy (midostaurin nebo avapritinib), které efektivně cílí na mastocyty s mutací D816V v *c-KIT* (Piris-Villaespesa, 2020).

Mutace genu *BRAF* bývají detekovány u různých malignit solidních tkání a byla popsána řada postupů detekce mutací *BRAF* pomocí dPCR (Malicherová *et al.*, 2018; Appay *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2020) a srovnávacích studií dPCR s alelově specifickou PCR resp. sekvenováním dle Sangera (Wang *et al.* 2019). Identifikace bodové mutace *BRAF* V600E v roce 2011 u pacienta s HCL přispěla k radikální změně pohledu na diagnostiku této nefrekventované indolentní malignity a otevřela nové možnosti diferenciální diagnostiky HCL od příbuzných neplázií (Maitre *et al.*, 2019).

V první části experimentální práce věnované HCL byla provedena analýza mutace *BRAF* V600E u 2 pacientů HCL1 a HCL2 pomocí komerčního kitu IDBRAF (ID Solutions). Experiment byl proveden na 6-barevné verzi Naica®. U každého pacienta byly analyzovány vzorky DNA získané z mononukleárních buněk periferní krve nebo kostní dřeně z doby diagnózy a 1 další odběr (Tab. 12). U všech analyzovaných vzorků byl prokázán nález bodové mutace *BRAF* V600E pomocí AS-PCR, která byla provedena v rámci rutinní diagnostiky v LMB HOK FNOL. Dle výsledků dPCR byla u pacienta HCL1 při diagnóze (8/2011) určena alelová nálož V600E mutace na úrovni 4.1 %, v dalším odběru bylo prokázáno 0.6 % alely s mutací V600E. U pacienta HCL2 byla detekována alelová nálož 0.5 % (odběr 5/2013) resp. 0.9 % (odběr 9/2021). V druhé části experimentální práce byla optimalizována metoda dPCR pro detekci bodové mutace V600E pomocí dPCR na principu alelově specifické amplifikace pomocí TaqMan sond na platformě QIAcuity. Po stanovení optimálních reakčních podmínek byly v rámci srovnávací analýzy vyšetřeny vzorky HCL1 a HCL2 z experimentu na Naica® systému. Bodová mutace *BRAF* V600E byla prokázána ve všech analyzovaných vzorcích, s alelovou náloží 2.11 % resp. 0.06 % ve dvou nezávislých odběrech u pacienta HCL1, resp. 0.02 % u pacienta HCL2 (odběr 9/2021). Na základě realizovaných experimentů byla mutace *BRAF* V600E detekována ve všech analyzovaných vzorcích, které vykazovaly V600E mutaci na základě detekce pomocí AS-PCR.

Odlíšné alelové frekvence získané detekcí na různých platformách dPCR mohou být ovlivněny řadou faktorů, včetně odlišného množství vstupní DNA do reakce (8.25 ng/25 µl reakce v experimentu Naica® vs 10 ng/40 µl reakce na QIAcuity), dizajnu detekce (multiplexní formát vs duplexní provedení) a v neposlední řadě je potřebné zdůraznit, že kit IDBRAF byl primárně navržen k detekci somatických mutací genu *BRAF* v FFPE tkáních nebo ve volné nádorové DNA a na analýzu genomické DNA nebyl plně optimalizován. Je pravděpodobné, že metoda detekce *BRAF* V600E bude vyžadovat další optimalizaci, bude taktéž doplněno stanovení citlivosti detekce na základě doplnění templátu se 100% zastoupením V600E mutace, který zatím nebyl k dispozici. Z předběžných výsledků provedených analýz je zřejmé, že zastoupení mutace *BRAF* V600E ve vzorcích HCL je nízké

a při zohlednění nedostatečné infiltrace vyšetřovaného biologického materiálu vyplývá, že přesná detekce a kvantifikace alelové nálože metodou dPCR bude přínosná.

V rámci experimentů věnovaným AML byla provedena analýza 5 pacientů s AML z doby diagnózy resp. z odběrů v průběhu *follow-up* a 2 negativních kontrol (Tab. 12). V 6 případech byl znám mutační profil *IDHI* na základě NGS analýzy, sekvenční analýza identifikovala u 5 pacientů mutaci *IDHI* R132H, u 1 pacienta byla prokázána mutace *IDHI* R132L. Na základě párové analýzy alelové nálože mutací *IDHI* R132X v diagnostických vzorcích resp. v dalších navazujících odběrech pomocí dPCR a NGS byla prokázána 100 % shoda v kinetice detekované alelové nálože. Analýza vzorku z období remise u pacienta AML 5, u kterého nebyla provedena analýza pomocí NGS, analýza dPCR nález *IDHI* R132 mutace neprokázala.

Na základě experimentů provedených v této diplomové práci je zřejmé, že alelová nálož mutací asociovaných s vybranými hematologickými malignitami včetně SM a HCL je obvykle nízká. Navíc, molekulární markery korelují s klinickým vývojem onemocnění, je proto potřebné zabezpečit jejich přesnou a citlivou detekci. Je vysoce pravděpodobné, že díky propojení všech dostupných vysoce citlivých a specifických technik molekulární analýzy (qPCR, dPCR, NGS) bude možné do budoucna zlepšit péči o pacienty a přizpůsobit léčebné postupy dle individuálních potřeb pacienta.

7 ZÁVĚR

V rámci experimentů provedených na platformě QIAcuity Four dPCR system byly optimalizovány 2 dPCR metodiky zaměřené na detekci bodové mutace D816V genu *c-KIT* u systemové mastocytózy a mutace V600E genu *BRAF* u vlasatobuněčné leukemie. Alelová nálož mutace D816V genu *c-KIT* byla pomocí dPCR určena celkem v 11 vzorcích pacienta se SM, které byly odebrány z doby diagnózy a následně v různých časech v průběhu monitorování klinického stavu. Analýza byla doplněna o párovou analýzu mutace D816V pomocí AS-PCR, která se využívá k detekci mutace D816V v rutinní diagnostice LMB HOK FNOL.

V rámci experimentů věnovaným HCL byla provedena paralelní analýza alelové nálože *BRAF* V600E u 2 pacientů na platformě Naica a QIAcuity.

U 5 pacientů s diagnózou AML byla provedena analýza bodových mutací *IDH1* genu v kodonu R132 pomocí komerčního multiplexního systému IDIDH1 (ID Solutions) a výsledky byly srovnány s alelovou náloží *IDH1* mutací určených pomocí NGS.

Získané výsledky potvrzují, že digitální PCR provedená na platformách Naica a QIAcuity představují vysoce citlivou a přesnou metodu, které bez nároku na čas a finance umožňují přesnou a citlivou identifikaci žádaných bodových mutací i při jejich nízké alelové náloži.

Určení bodových mutací pomocí digitální PCR vhodně doplní dostupné techniky analýzy bodových mutací založené na alelově specifické PCR amplifikaci a sekvenování. Výsledky této práce přispívají k zpřesnění analýzy bodových mutací *c-KIT*^{D816V} a *BRAF*^{V600E} v Laboratoři molekulární biologie HOK FNOL.

8 LITERATURA

Alaggio R., Amador C., Anagnostopoulos I., Attygalle A. D., Araujo I. B. O., Berti E., Bhagat G., Borges A. M., Boyer D., Calaminici M., Chadburn A., Chan J. K. C., Cheuk W., Chng W. J., Choi J. K., Chuang S. S., Coupland S. E., Czader M., Dave S. S., de Jong D., Du M. Q., Elenitoba-Johnson K. S., Ferry J., Geyer J., Gratzinger D., Guitart J., Gujral S., Harris M., Harrison C. J., Hartmann S., Hochhaus A., Jansen P. M., Karube K., Kempf W., Khoury J., Kimura H., Klapper W., Kovach A. E., Kumar S., Lazar A. J., Lazzi S., Leoncini L., Leung N., Leventaki V., Li X. Q., Lim M. S., Liu W. P., Louissaint A. Jr., Marcogliese A., Medeiros L. J., Michal M., Miranda R. N., Mitteldorf C., Montes-Moreno S., Morice W., Nardi V., Naresh K. N., Natkunam Y., Ng S. B., Oschlies I., Ott G., Parrens M., Pulitzer M., Rajkumar S. V., Rawstron A. C., Rech K., Rosenwald A., Said J., Sarkozy C., Sayed S., Saygin C., Schuh A., Sewell W., Siebert R., Sohani A. R., Tooze R., Traverse-Glehen A., Vega F., Vergier B., Wechalekar A. D., Wood B., Xerri L., Xiao W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* **36**(7), 1720-1748.

Appay R., Fina F., Baretts D., Gallardo C., Nanni-Metellus I., Scavarda D., Henaff D., Vincent J., Grewis L., Pourquier P., Colin C., Figarella-Branger D. (2020). Multiplexed Droplet Digital PCR Assays for the Simultaneous Screening of Major Genetic Alterations in Tumors of the Central Nervous System. *Frontiers in Oncology* **10**, 579762.

Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. J., Le Beau M. M., Bloomfield C. D., Cazzola M., Vardiman J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, **127**(20), 2391–2405.

Arcaini L., Zibellini S., Boveri E., Riboni R., Rattotti S., Varettoni M., Guerrera M. L., Lucioni M., Tenore A., Merli M., Rizzi S., Morello L., Cavalloni C., Da Vià M. C., Paulli M., Cazzola M. (2012). The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood* **119**(1), 188-191.

Bruijns B., Tiggelaar R., Gardeniers H. (2018). Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis* **39**(21), 2642-2654.

Cilloni D., Petiti J., Rosso V., Andreani G., Dragani M., Fava C., Saglio G. (2019). Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR? *International Journal of Molecular Sciences* **20**(9), 2249.

DiJulio J. (1991). Hematopoiesis: an overview. *Oncology Nursing Forum* **18**(2 Suppl), 3-6.

DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, Konopleva M, Döhner H, Letai A, Fenaux P, Koller E, Havelange V, Leber B, Esteve J, Wang J, Pejsa V, Hájek R, Porkka K, Illés Á, Lavie D, Lemoli RM, Yamamoto K, Yoon SS, Jang JH, Yeh SP, Turgut M, Hong WJ, Zhou Y, Potluri J, Pratz KW. (2020). Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* **383**(7), 617-629.

Dong L, Wang X, Wang S, Du M, Niu Ch, Yang J, Li L, Zhang G, Fu B, Gao Y, Wang J. (2020). Interlaboratory assessment of droplet digital PCR for quantification of BRAF V600E mutation using a novel DNA reference material. *Talanta* **207**.

- Erben P, Schwaab J, Metzgeroth G, Horny HP, Jawhar M, Sotlar K, Fabarius A, Teichmann M, Schneider S, Ernst T, Müller MC, Giehl M, Marx A, Hartmann K, Hochhaus A, Hofmann WK, Cross NC, Reiter A. (2014). The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Annals of Hematology* **93**(1), 81-88.
- Galimberti S., Balducci S., Guerrini F., Del Re M., Cacciola R. (2022). Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagnostics (Basel)* **12**(6), 1305.
- Grassi S, Guerrini F, Ciabatti E, Puccetti R, Salehzadeh S, Metelli MR, Di Vita A, Domenichini C, Caracciolo F, Orciuolo E, Pelosini M, Mazzantini E, Rossi P, Mazziotta F, Petrini M, Galimberti S. (2020). Digital Droplet PCR is a Specific and Sensitive Tool for Detecting IDH2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Cancers (Basel)* **12**(7), 1738.
- Greiner G, Gurbisz M, Ratzinger F, Witzeneder N, Class SV, Eisenwort G, Simonitsch-Klupp I, Esterbauer H, Mayerhofer M, Müllauer L, Sperr WR, Valent P, Hoermann G. (2020). Molecular quantification of tissue disease burden is a new biomarker and independent predictor of survival in mastocytosis. *Haematologica* **105**(2), 366-374.
- Guerrini F, Paolicchi M, Ghio F, Ciabatti E, Grassi S, Salehzadeh S, Ercolano G, Metelli MR, Del Re M, Iovino L, Petrini I, Carulli G, Cecconi N, Rousseau M, Cervetti G, Galimberti S. (2016). The Droplet Digital PCR: A New Valid Molecular Approach for the Assessment of B-RAF V600E Mutation in Hairy Cell Leukemia. *Front Pharmacol.* **7**, 363.
- Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, Kundi M, Greiner G, Wimazal F, Hadzijasufovic E, Mitterbauer G, Mannhalter C, Valent P, Sperr WR. (2014). The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy* **69**(6), 810-803.
- Hrstka R., Kolářová T., Michalová E., Vojtěšek B. (2014). Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi, *Klinická Onkologie* **27**, 69–74.
- Jagannathan-Bogdan M., Zon L. I. (2013). Hematopoiesis. *Development* **140**(12), 2463-2467.
- Jurlander J. (2017). Hematological Malignancies, Leukemias and Lymphomas. *Encyclopedia of Cancer*, 1640–1644.
- Kantarjian H. M., DeAngelo D. J., Stelljes M., Liedtke M., Stock W., Gökbuget N., O'Brien S. M., Jabbour E., Wang T., Liang White J., Sleight B., Vandendries E., Advani A. S. (2019). Inotuzumab ozogamicin versus standard of care in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: Final report and long-term survival follow-up from the randomized, phase 3 INOVATE study. *Cancer* **125**(14), 2474-2487.
- Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB, Broesby-Olsen S., Mastocytosis Centre, Odense University Hospital (MastOUH). (2014). Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol.* **89**(5), 493-498.
- Kumar K. R., Cowley M. J., Davis R. L. (2019). Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **45**(7), 661-673.

- Lambert J., Pautas C., Terré C., Raffoux E., Turlure P., Caillot D., Legrand O., Thomas X., Gardin C., Gogat-Marchant K. (2019). Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: Final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica* **104**, 113–119.
- Madic J., Zocevic A., Senlis V., Fradet E., Andre B., Muller S., Dangla R., Droniou M. E. (2016). Three-color crystal digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification* **10**, 34–46.
- Machová-Poláková K., Čuřík N., Votavová H., Trka J. (2019). 25 let vývoje metod molekulární biologie a jejich uplatnění v hemato(onko)logii. *Transfúze a hematologie dnes* **25**, No. 1, 34–42.
- Maitre E., Cornet E., Troussard X. (2019). Hairy cell leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology* **94**(12), 1413–1422.
- Malicherová B, Burjanivova T, Minarikova E, Kašubová I, Hurová T, Dobrovska M, Homola I, Lasabova Z, Plank L (2018). Detection of driver mutations in FFPE samples from patients with verified malignant melanoma. *Neoplasma* **66**(1).
- Martelli M., Monaldi C., De Santis S., Bruno S., Mancini M., Cavo M., Soverini S. (2020). Recent Advances in the Molecular Biology of Systemic Mastocytosis: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(11), 3987.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51** Pt 1, 263–273.
- Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E., Powell S. J., Summers C., Kalsheker N., Smith J. C., Markham A. F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* **17**(7), 2503–2316.
- Pardanani A. (2021). Systemic mastocytosis in adults: 2021 Update on diagnosis, risk stratification and management. *American Journal of Hematology* **96**(4), 508–525.
- Pecoraro S., Berben G., Burns M., Corbisier P., De Giacomo M., De Loose M., Dagand E., Dobnik D., Eriksson R., Holst-Jensen A., Kagkli D., Kreysa J., Lievens A., Made D., Mazzara M., Paterno A., Peterseil V., Savini C., Sovová T., Sowa S., Spilsberg B. (2019). Overview and recommendations for the application of digital PCR, EUR 29673 EN, *Publications Office of the European Union, JRC Publications Repository*, ISBN 978-92-76-00182-9.
- Piris-Villaespesa M., Alvarez-Twose I. (2020). Systemic Mastocytosis: Following the Tyrosine Kinase Inhibition Roadmap. *Frontiers in Pharmacology* **11**, 443.
- Quan P.-L., Sauzade M., Brouzes E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, **18**(4), 1271.
- Ratajczak M. Z. (2019). Stem Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 1201.
- Rodriguez-Galindo C, Allen CE. (2020). Langerhans cell histiocytosis. *Blood* **135**(16), 1319–1331.

- Shi K., Chen Y., Yin Y., Long F., Feng S., Liu H., Qu S., Si H. (2022). A Multiplex Crystal Digital PCR for Detection of African Swine Fever Virus, Classical Swine Fever Virus, and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Frontiers in Veterinary Science* **9**, 926881.
- Schumacher J. A., Elenitoba-Johnson K. S., Lim M. S. (2008). Detection of the c-kit D816V mutation in systemic mastocytosis by allele-specific PCR. *Journal of Clinical Pathology* **61**(1), 109-114.
- Stone R.M., Mandrekar S.J., Sanford B.L., Laumann K., Geyer S., Bloomfield C.D., Thiede C., Prior T.W., Döhner K., Marcucci G. (2017). Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *The New England Journal of Medicine* **377**, 454-464.
- Tan L. L., Loganathan N., Agarwalla S., Yang C., Yuan W., Zeng J., Wu R., Wang W., Duraiswamy S. (2022). Current commercial dPCR platforms: technology and market review. *Critical Reviews in Biotechnology* 1-32.
- Tiacci E., Trifonov V., Schiavoni G., Holmes A., Kern W., Martelli M. P., Pucciarini A., Bigerna B., Pacini R., Wells V. A., Sportoletti P., Pettirossi V., Mannucci R., Elliott O., Liso A., Ambrosetti A., Pulsoni A., Forconi F., Trentin L., Semenzato G., Inghirami G., Capponi M., Di Raimondo F., Patti C., Arcaini L., Musto P., Pileri S., Haferlach C., Schnittger S., Pizzolo G., Foà R., Farinelli L., Haferlach T., Pasqualucci L., Rabadan R., Falini B. (2011). BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *The New England Journal of Medicine* **364**(24), 2305-2315.
- Tiacci E., De Carolis L., Simonetti E., Capponi M., Ambrosetti A., Lucia E., Antolino A., Pulsoni A., Ferrari S., Zinzani PL, Ascani S, Perriello VM, Rigacci L, Gaidano G, Della Seta R, Frattarelli N, Falcucci P, Foà R, Visani G, Zaja F, Falini B. (2021). Vemurafenib plus Rituximab in Refractory or Relapsed Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J* **384**(19), 1810-1823.
- Tiwari A., Ahmed W., Oikarinen S., Sherchan S. P., Heikinheimo A., Jiang G., Simpson S. L., Greaves J., Bivins A. (2022). Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring. *Science of the Total Environment* **837**, 155663.
- Tran TV, Dang KX, Pham QH, Nguyen UD, Trinh NTT, Hoang LV, Ho SA, Nguyen BV, Nguyen DT, Trinh DT, Tran DN, Orpana A, Stenman UH, Stenman J, Ho TH. (2020). Evaluation of the expression levels of BRAF V600E mRNA in primary tumors of thyroid cancer using an ultrasensitive mutation assay. *BMC Cancer* **20**(1), 368.
- Váňová B., Malicherova B., Burjanivová T., Líšková A., Janíková K., Jašek K., Lasabová Z., Tatar M., Plank L. (2021). Droplet digitálna PCR ako nový diagnostický nástroj. *Klinická onkologie* **34**(1), 33-39.
- Wang Z, Sun K, Jing C, Cao H, Ma R, Wu J. (2019). Comparison of droplet digital PCR and direct Sanger sequencing for the detection of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **33**(6), e22902.
- Whale A. S., Huggett J. F., Tzonev S. (2016). Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification* **10**, 15-23.

Manuály:

Qiagen. (2019) QIAamp® Circulating Nucleic Acid Handbook [online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=0c4b31ab-f4fb-425f-99bf-10ab9538c061&lang=en>

Qiagen. (2020) QIAquick® Spin Handbook [online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17>

Qiagen. (2021) QIAcuity User Manual [online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=ad681197-cdf1-401c-89c7-2db518129e86&lang=en>

Qiagen. (2021) QIAcuity® User Manual Extension: Application Guide [online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=5d19083d-fa10-4ed2-88a0-2953d9947e0c&lang=en>

Qiagen. (2021) QIAcuity® Probe PCR Kit [online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=1f29fe9f-8983-4a27-af2a-202a0cc94058&lang=en>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AML	akutní myeloidní leukémie
AS-PCR	alelově specifická PCR
<i>BRAF</i>	gen pro protein B-Raf
cDNA	komplementární DNA
<i>c-KIT</i>	gen pro tyrozinkinázový receptor
ddPCR	dropletová digitální PCR
ddNTPs	dideoxyribonukleotidtrifosfáty
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
dPCR	digitální PCR
dsDNA	dvouřetězcová DNA
F	forward – vedoucí vlákno DNA
HCL	vlasatobuněčná leukémie
<i>IDH1/2</i>	izocitrátdehydrogenáza 1 a/nebo 2
KD	kostní dřev
LMB HOK FNOL	Laboratoř molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc
LNA	locked nucleic acid
MRD	minimální reziduální choroba
MUT	mutace
NGS	sekvenování nové generace
NK	negativní kontrola
NTC	netemplátová kontrola
PCR	polymerázová řetězová reakce
PK	periferní krev
PK	pozitivní kontrola
qPCR	kvantitativní PCR
R	reverse – reverzní vlákno DNA
RFU	relativní fluorescenční jednotka
RNA	ribonukleová kyselina
SCF	stem cell faktor
SM	systemová mastocytóza
WHO	Světová zdravotnická organizace
WT	<i>wild-type</i>