

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Využití digitální PCR u myeloproliferativních
onemocnění**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kristýna Nováková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Navrátilová Jana, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2024

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením Mgr. Navrátilové Jany, Ph.D., za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí Mgr. Navrátilové Janě, Ph.D., za odborné vedení, pomoc se zpracováním a v neposlední řadě za cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu hemato-onkologického oddělení FN Olomouc za veškerou pomoc a vstřícnost.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kristýna Nováková
Název práce	Využití digitální PCR u myeloproliferativních onemocnění
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Navrátilová Jana, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Digitální polymerázová řetězová reakce (dPCR) představuje inovativní metodu pro absolutní kvantifikaci cílových variant a mutací na úrovni nukleových kyselin s vysokou přesností a citlivostí. Tato technologie umožňuje rozdělení vzorku do tisíců kompartmentů, kde probíhá PCR amplifikace a následná detekce cílových molekul. Díky svým výhodám nachází dPCR široké uplatnění v oblastech klinické diagnostiky, mikrobiologie, genové terapie a prenatální diagnostiky. Tato diplomová práce předkládá komplexní přehled o historii, vývoji, molekulární podstatě a významu digitální PCR pro molekulární biologii a medicínu. Rovněž sleduje vývoj v daných oblastech. V experimentální části práce byla optimalizována metoda dPCR pro detekci mutací v genech <i>JAK2</i> a <i>MPL</i> u pacientů s Ph – negativním myeloproliferativním onemocněním.</p>
Klíčová slova	digitální PCR, <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> , Ph – negativní myeloproliferativní neoplázie
Počet stran	54
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Kristýna Nováková
Title of thesis	The use of digital PCR in myeloproliferative disorders,
Department	Laboratory of Molecular Biology
Type of thesis	Diploma
Department	The laboratory of growth regulators
Supervisor	Mgr. Navrátilová Jana, Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	Digital polymerase chain reaction (dPCR) is an innovative method for absolute quantification of targeted variants and mutations at the nucleic acid level with high accuracy and sensitivity. This technology allows the sample to be divided into thousands of compartments for PCR amplification and subsequent detection of target molecules. Due to its advantages, dPCR is widely used in the fields of clinical diagnostics, microbiology, gene therapy and prenatal diagnostics. This thesis provides a comprehensive overview of the history, development, molecular basis and importance of digital PCR for molecular biology and medicine. It offers perspectives on future developments. In the experimental part, the dPCR method was optimized for the simultaneous detection of mutations in <i>JAK2</i> and <i>MPL</i> genes in patients with Ph-negative myeloproliferative disease.
Keywords	digital PCR, Janus kinase, Thrombopoietin receptor, Ph-negative myeloproliferative neoplasm
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část práce	9
2.1 Hematopoéza	9
2.2 Myeloproliferativní onemocnění	10
2.2.1 Historie	12
2.3 Molekulární podstata myeloproliferativních onemocnění	13
2.4 Historie PCR.....	15
2.5 Digitální PCR	17
2.5.1 Využití a aplikace digitální PCR	21
3. Experimentální část práce	25
3.1 Soubor pacientů	25
3.2 Materiál a příslušenství	25
3.2.1 Přístroje.....	25
3.2.2 Laboratorní materiál	26
3.2.3 Komerčně dostupné chemikálie a roztoky.....	26
3.3 Metody.....	27
3.3.1 Digitální PCR od firmy Naica® system (Stilla Technologies)	27
3.3.2 Komerčně dostupné reakční směsi, oligonukleotidy a sondy pro dPCR.....	27
3.4 Postup	28
4. Výsledky	32
4.1 Kompenzace dPCR.....	32
4.2 Optimalizace dPCR	34
4.3 Stanovení optimální koncentrace sondy	36
4.4 Vliv stavu templátu na PCR	37
4.5 Koncentrační řada pozitivních kontrol	39
5. Diskuze	41
6. Závěr	45

Cíle práce:

1. Literární přehled o digitální polymerázové řetězové reakci (dPCR) včetně historie, principů, molekulární podstaty a významu této technologie pro molekulární biologii a medicínu.
2. Zavedení a optimalizace simultánní detekce mutací v genech *MPL* a *JAK2* pomocí digitální PCR u Ph-negativních MPN typu PV, PMF a ET.
3. Vyhodnocení výsledků vlastní analýzy provedenou metodou dPCR.

1. Úvod

Ph-negativní myeloproliferativní onemocnění (MPN) patří ke klonálním poruchám hematopoézy. V rutinní diagnostice se u nich vyšetřují 3 základní „*driver*” mutace v genech *JAK2* (Janusova kináza), *CALR* (kalretikulín) a *MPL* (trombopoetinový receptor). Mutace v genu *MPL* se u pacientů s primární myelofibrózou (PMF) a esenciální trombocytémií (ET) vyskytují v nízké alelické náloži, především je-li onemocnění diagnostikováno na začátku. U 5 % pacientů s pravou polycytémií (PV), u nichž není prokázána mutace *JAK2* V617F, by měly být detekovány mutace v exonu 12 genu *JAK2*. Klasické Sangerovo sekvenování využívané pro detekci těchto mutací má limitující citlivost (15-20 % VAF). Je vhodné dané mutace vyšetřovat pomocí citlivějších metod, jako jsou alelově specifická PCR, analýza křivky tání (HRM) či digitální PCR.

Digitální PCR umožňuje absolutní kvantifikaci cílových sekvencí bez potřeby přítomnosti standardní křivky, což představuje významný posun oproti tradičním metodám, jako jsou konvenční PCR a kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Principem dPCR je rozdělení vzorku do tisíců oddělených reakčních kompartmentů, kde probíhá PCR amplifikace. Následně se detekuje přítomnost cílových molekul v jednotlivých kompartmentech, což umožňuje přesné měření počtu jednotlivých cílů.

V rámci této diplomové práce jsme se zaměřili na důkladné pochopení principu, molekulární podstaty a aplikací digitální PCR. Prozkoumáme různé platformy digitální PCR a jejich využití v široké škále oblastí včetně klinické diagnostiky, prenatální diagnostiky, mikrobiologie, monitorování životního prostředí a genové terapie. Dále se budeme zabývat výhodami digitální PCR oproti konvenčním metodám a jejími perspektivami ve vývoji v oblasti molekulární biologie a medicíny.

Cílem teoretické části práce je poskytnout komplexní přehled o digitální PCR, jejích aplikacích a výhodách, ukázat její významný potenciál pro pokrok v diagnostice, terapii a výzkumu. Zároveň se pokusíme identifikovat klíčové oblasti, ve kterých lze digitální PCR využít k řešení současných výzev v oblasti medicíny a biologie.

Experimentální část práce se věnuje optimalizaci metody dPCR a jejímu využití při detekci mutací v genech *JAK2* a *MPL* u pacientů s Ph-negativním myeloproliferativním onemocněním typu PV, PMF a ET.

2. Teoretická část práce

2.1 Hematopoéza

Hematopoéza představuje děj, při kterém se neustále vytváří a obnovují všechny krevní buňky z důvodu jejich limitované životnosti (Jagannathan-Bogdan & Zon, 2013).

K primární krve tvorbě dochází již během embryonálního vývoje, kdy se krevní buňky hromadí ve formě shluků tvořících ostrůvky ve žloutkovém vaku. Během nitroděložního vývoje se tyto prekurzory přesouvají do jater, sleziny a lymfatických uzlin. Poté se ustálí v kostní dřeni a následně některé z nich migrují do sekundárních lymfatických orgánů jako je brzlík (Wertheim & Bagg, 2014).

Všechny typy krevních buněk se vyvíjejí z takzvaných multipotentních kmenových buněk zvaných hematopoetické kmenové buňky (HSC angl. *Hematopoietic stem cells*). Z nich se poté vyvíjejí dvě základní linie, a to myeloidní progenitory (CMP angl. *common myeloid progenitor*) a lymfoidní progenitory (CLP angl. *common lymphoid progenitor*). Z těchto progenitorů se diferenciací vyvíjejí zralé krevní elementy (Manz & Boettcher, 2014). Dojde-li k nádorové transformaci, například poškozením genetické informace těchto buněk nebo narušením fyziologických mechanismů spojených s hematopoézou, může vzniknout hematologická malignita (Bernt & Armstrong, 2009).

Leukocyty neboli bílé krvinky se podílejí na správné funkci imunitního systému nejen tvorbou antigenních receptorů rozpoznávajících cizorodé látky ale i fagocytózou. Leukocyty rozdělujeme na agranulocyty, mezi které patří lymfocyty a monocyty. Dále na granulocyty, mezi které náleží neutrofilní granulocyty neboli neutrofilny, eosinofilní granulocyty neboli eozinofily a bazofilní granulocyty neboli bazofily.

Mezi největší bílé krvinky se řadí monocyty patřící mezi prekurzory makrofágů. V cytoplazmě obsahují velké množství vakuol. Jeho úlohou je fagocytóza cizorodých tělísek přímo ve tkáních. Náleží do skupiny antigen prezentujících buněk.

B-lymfocyty (B - angl. *bone marrow*) vznikají a dozrávají v kostní dřeni. Konečným diferenciacním stádiem těchto buněk jsou plazmatické buňky, které produkují protilátky

proti bílkovinným a glykoproteinovým antigenům či toxinům (Cui *et al.*, 2010). T-lymfocyty dozrávají v thymu. Rozlišujeme je podle funkce a CD (angl. *cluster of-differentiation*) znaků vyskytujících se na jejich povrchu na pomocné (angl. *helper*) T_H-lymfocyty, cytotoxické T_{Cyt}-lymfocyty, supresorové T_{Sup}-lymfocyty a přirozeně zabíjející NK buňky (Rodak *et al.*, 2007). NK buňky působí cytotoxicky na buňky nádorové nebo virem napadené (Pecka, 2002).

Granulocyty mají hlavní funkci, a to fagocytózu. Základní schopností makrofágů je fagocytóza cizorodých materiálů, rozpadlých buněk či mikroorganismů (Cui *et al.*, 2010). Granulocytární buňky se svou schopností fagocytovat podílí na nespecifické imunitě. Neutrofilní granulocyty patří mezi nejpočetnější leukocyty cirkulující v krevním řečišti. Tyto buňky obsahují lytické enzymy jako například lysozomy, autolyziny či endolyziny (Toman *et al.*, 2007). Eosinofilní a bazofilní granulocyty jsou schopny degranulace. Jsou zapojeny do různých zánětlivých procesů, jako například alergické reakce či eliminace parazitárních onemocnění (Cui *et al.*, 2010). Při vyšetření krevního obrazu hodnoty leukocytů u žen i mužů činí $4-10 \times 10^9$ na liter (Dean, 2005).

Z myeloidní linie vznikají i erytrocyty (červené krvinky) obsahující barvivo hemoglobin, jehož hlavní funkcí je přenos krevních plynů, zejména kyslíku (O₂) z plicních kapilár do tkání. Erytrocyty jsou nejpočetnější skupinou krevních buněk, neobsahují žádné jádro, nemohou se samy dělit a jejich životnost je přibližně 120 dní. Jejich referenční meze při vyšetření krevního obrazu by měla činit u žen rozmezí $3,80 - 5,20 \times 10^{12}$ na liter a u mužů $4,00 - 5,80 \times 10^{12}$ na liter (Cimen, 2008).

Krevní destičky neboli trombocyty patří mezi nejmenší krevní elementy. Také neobsahují buněčné jádro. Podílejí se na procesu srážení krve neboli hemostáze. Jejich referenční rozmezí u mužů a žen se pohybuje mezi $150-450 \times 10^9$ na liter (Schlesinger, 2005).

2.2 Myeloproliferativní onemocnění

Myeloproliferativní onemocnění (MPN angl. *myeloproliferative neoplasms*) se řadí mezi klonální poruchy hematopoézy. Jako první zavedl termín „myeloproliferativní nemoci“

(MPD angl. *myeloproliferative disorder*) v roce 1951 William Dameshek, který do nich mimo jiné zahrnoval polycytemii vera (PV angl. *polycythemia vera*), esenciální trombocytémii (ET angl. *essential thrombocythaemia*), primární myelofibrózu (PMF angl. *primary myelofibrosis*), chronickou myeloidní leukémií (CML angl. *chronic myelogenous leukemia*) a Di Guglielmův syndrom zvaný jako erytroleukémie (Vannucchi *et al.*, 2009).

PV se vyznačuje zvýšeným počtem červených krvinek a hladinou hemoglobinu v periferní krvi. Na základě studií byla nejvyšší incidence tohoto onemocnění prokázána přibližně u 22 případů na 100 000 obyvatel/rok ve věku 60–65 let (Raedler, 2014). CML je charakterizována přítomností specifické genetické abnormality, Philadelphského chromozomu (Ph angl. *Philadelphia chromosome*) a zvýšeného počtu leukocytů v periferní krvi. Výskyt tohoto onemocnění byl prokázán u 1-2 případů na 100 000 obyvatel/rok ve věku 60–65 let (Gupta *et al.*, 2016). ET jako nádorové onemocnění je charakterizováno zvýšeným počtem krevních destiček a obvyklý výskyt tohoto onemocnění činí 1,5 případů na 100 000 obyvatel/rok. Nejen trombocytémie je spojována se záněty, infekcemi a rozvojem sekundárních malignit (Penka *et al.*, 2005). Podstatou onemocnění PMF, s incidencí 1,5 případů na 100 000 obyvatel/rok, je nahrazování krvetvorné tkáně v kostní dřeni kolagenním vazivem produkovaným patologickými megakaryoblasty. Tím se snižuje produkce všech krevních elementů, které následně chybí v periferní krvi (Vannucchi *et al.*, 2009).

V rutinní diagnostice se u těchto onemocnění vyšetřují řídicí tzv. „*driver*“ mutace ve třech genech, jež patří k molekulárním markerům. Jsou to mutace v genech *JAK2* (Janusova kináza), *CALR* (kalretikulín) a *MPL* (trombopoetinový receptor). Byly postupně přidány k dříve popsané genetické změně, fúznímu genu *BCR/ABL1*. Tyto mutace způsobující změny v sekvencích DNA hrají klíčovou roli ve vzniku a rozvoji nádorové populace. Proto objevení těchto molekulárních markerů vedlo nejen ke zlepšení klinické diagnostiky, ale i následnému vývoji specifických terapeutických cílů (např. JAKAVI – inhibitor JAK2 kinázy).

2.2.1 Historie

Již v roce 1845 John Bennett a Rudolf Virchow označili CML jako chronickou granulocytární leukémií. Koncem roku 1879 německý chirurg Gustav Heuck jako první popsal PMF u pacientů s masivní splenomegálií. Histologické nálezy vykazovaly přítomnost fibrózy kostní dřene, osteosklerózu a rozsáhlou extramedulární hematopoézu. V roce 1892 francouzský lékař Louis Henri Vaquez a později americký Richard Clark Cabot popsali příznaky onemocnění PV, které spojovali se zvýšeným počtem červených krvinek. William Dameshek byl ale první, kdo na konci devatenáctého století použil termín myeloproliferativní onemocnění. Jeho přínos spočíval v rozpoznání generalizované myeloproliferace v kostní dřeni (Tefferi, 2008). PV dle něj vykazovala přítomnost hypercelulární kostní dřene. William Vainchenker následně potvrdil hypotézu Williama Dameshka o trilineární PV svým objevem mutace *JAK2* V617F. Přítomnost této mutace vedla k erytrocytární, megakaryocytární a granulocytární myeloproliferaci spojené se třemi klinickými fenotypy MPN (ET, PV a myeloidní neoplázie sleziny (MNS) se sekundární myelofibrózou) (Michiels *et al.*, 2016). William Osler v roce 1903 odlišil PV od relativní polycytémie a sekundární polycytémie. Rakouští patologové Emil Epstein a Alfred Goedel poprvé v roce 1934 popsali esenciální trombocytémii, kterou dříve definovali jako hemoragickou trombocytémii, poruchu charakterizovanou trombocytózou, trombózą a krvácivou diatézou (Tefferi, 2008).

Převratným objevem byl průkaz spojitosti mezi CML a vznikem abnormálního chromozomu nazvaného Philadelphia (Ph) (Minciacchi *et al.*, 2021). Americký biolog Peter Nowell v roce 1960 pomocí Giemsova barvení vizualizoval metafázní chromozomy nádorových buněk pocházejících z kostní dřene myši, kterým byla naočkována CML. S pomocí Davida Hungerforda objevili a popsali malý Ph chromozom, jenž připomínal gonozom Y, nejen u myši, ale i u pacientů s CML. Tyto objevy odlišily CML od jiných MPN. Dnes se ale označení Ph-negativní MPN používá pouze pro PV, ET a PMF. V letech 1967 až 1981 Philip Fialkow učinil hlavní krok k pochopení základní etiologie MPN. Využil polymorfismy v lokusu glukóza-6- fosfát dehydrogenázy vázané na chromozom X, aby prokázal, že všechny čtyři klasické MPN se řadí mezi onemocnění klonálních hematopoetických kmenových buněk. Jeho výzkumy ukázaly, že myeloproliferativní poruchy jsou klonálního původu a zasahují všechny typy myeloidních buněk. To poskytlo první důkazy o tom, že se jedná o hematologické malignity (Tremblay *et al.*, 2021). V roce

2006 byla popsána somatická mutace W515L v exonu 10 genu *MPL* (Guglielmelli & Calabresi, 2021). Další mutace u *JAK2* V617F F-negativních PV byly popsány v roce 2007 (Passamonti *et al.*, 2011). V roce 2013 byly popsány mutace *CALR* u MPN, který není mutovaný u pacientů s PV (Tefferi & Pardanani, 2014).

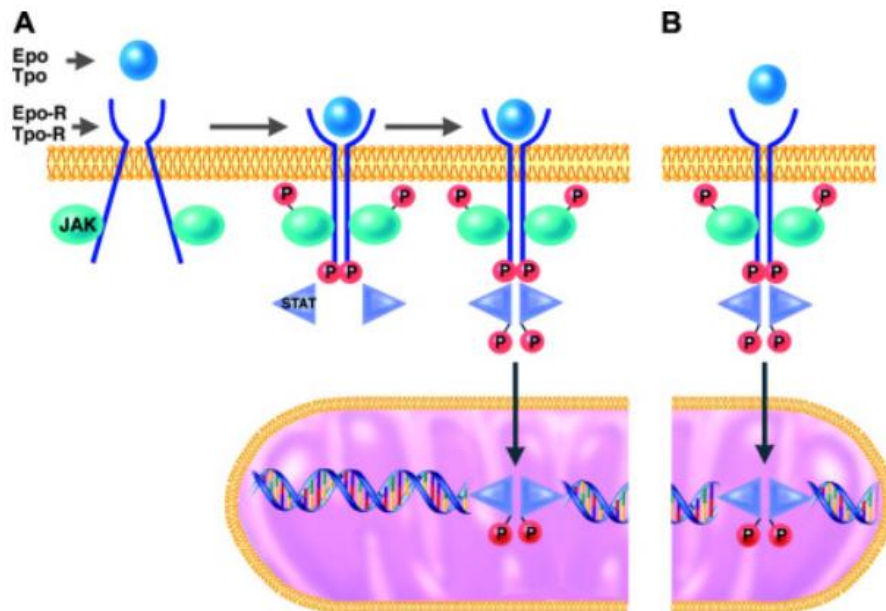
2.3 Molekulární podstata myeloproliferativních onemocnění

Myeloidní neoplázie jsou chronická onemocnění charakterizovaná zvýšenou produkcí terminálně diferencovaných buněk. V roce 2005 byla objevena nejčastější mutace V617F v exonu 14 genu *JAK2*, která je přítomna u 95 % pacientů s PV, 50 % pacientů s ET a PMF (Them & Kralovics, 2013). V roce 2007 byly popsány mutace v exonu 12 u *JAK2* V617F – negativních pacientů s PV, u kterých převládala výrazná erytrocytóza (Tefferi, 2008).

Jsou známy čtyři JAK kinázy, a to JAK1, JAK2, JAK 3 a tyrozinkináza 2. Proteiny obsahují sedm domén. Doména JH je enzymaticky aktivní kinázová doména (angl. *Janus Homology domain 1*). Katalyticky neaktivní pseudokinázová doména JH2 (angl. *Janus Homology domain 2*), dále oblast FERM (angl. *F for 4.1 protein, E for ezrin, R for radixin and M for moesin*) a doména SH2 (angl. *Src Homology domain 2*) jsou dalšími důležitými doménami proteinu. Pseudokinázová doména JH2 má autoinhibiční účinek, který za běžných podmínek potlačuje kinázovou aktivitu JAK2. Jednou z nejčastějších mutací je záměna G/T kódující substituci valinu na fenylalanin v pozici 617 v doméně JH2 *JAK2*. Mutace ruší autoinhibiční účinek JH2 a vede k neustálé aktivaci této signální dráhy (Schafer, 2006).

Dalšími mutacemi mohou být mutace v exonu 12 genu *JAK2*, které zapříčiňují nezávislou aktivaci JH1. Dochází k neregulovatelné fosforylaci signalizační dráhy JAK2/STAT (Jang & Choi, 2020). Janusova kináza patří do skupiny tyrozin kináz fungujících jako transduktor mezi hematopoetickým cytokinovým receptorem na membráně a další intracelulární signální molekulou STAT. K samotné aktivaci JAK2 dochází po změně konformace receptoru, na který se váže ligand, například erythropoetin. JAK2 se nachází v těsné blízkosti receptoru. Po transforylaci receptoru dochází k fosforylaci samotné JAK2 kinázy. Vnitřní cytoplazmatické domény receptorů fosforylují JAK2. STAT představuje cytoplazmatickou signální molekulu, která bývá aktivována fosforylací tyrozinových zbytků za pomoci kinázy JAK. STAT se díky svým SH2 doménám váže

na sekvenční cytoplazmatické domény receptoru, která obsahuje fosfotyrosin. Díky fosforylaci tyrozinu STAT vytvoří dimery, které následně vstupují do jádra, kde hrají roli transkripčních faktorů skrze vazbu na regulační sekvenční genů. Důsledkem hyperaktivace signální dráhy je nekontrolovaná buněčná proliferace a přežívání hematopoetických prekurzorů (Lu *et al.*, 2005).



Obr.č.1: Schéma zobrazující signalizační dráhu JAK-STAT (Schafer, 2006).

Z klinických studií vyplývá, že všichni pacienti s PV jsou nositeli mutace *JAK2*, a to buď mutace V617F nebo mutací v exonu 12. U pacientů s ET nebo PMF jsou detekovány mutace *JAK2* V617F, případně *MPL* či *CALR*. Podle světové zdravotnické organizace (WHO) je přítomnost mutace *JAK2* pro PV a přítomnost mutací v *MPL* a *CALR* u ET a PMF považována za diagnostický marker těchto onemocnění (Tefferi, 2008).

Lidský gen *MPL* (MPL Proto-Oncogene, Thrombopoietin Receptor) se řadí mezi hematopoetické receptory a hraje klíčovou roli ve vývoji megakaryocytů a krevních destiček. Gen *MPL* se nachází na chromozomu 1 a obsahuje 12 exonů (Tefferi, 2008). Kóduje trombopoetinový receptor (TPO) hematopoetického růstového faktoru trombopoietinu. Mutace v *MPL* indukují stabilní dimerizaci, která vede k aktivaci *JAK2* v trombopoetinové dráze (Guglielmelli & Calabresi, 2021). Jednou z nejčastějších mutací je mutace v exonu 10 genu *MPL* kódující substituci tryptofanu na pozici 515 za jinou aminokyselinu, a to lysin nebo leucin. Následkem je nezávislá aktivace *MPL* na trombopoietinu, která aktivuje signalizační dráhu JAK-STAT (Jang & Choi, 2020).

Na základě studií byly mutace MPN rozděleny do 4 kategorií. První kategorie označuje bodové mutace *MPL* u kongenitálních amegakaryocytárních trombocytopenií (CAMT). Druhá kategorie zahrnuje mutace u hereditárních trombocytémií (HT). Zde se řadí mutace S505N, K39N a P106L. Třetí kategorií jsou mutace W515L, W515K u myeloproliferativních neoplázií (MPN), dále mutace u refrakterních anémií s prstenčitými sideroblasty s výraznou trombocytozou (MDS RARS-t) a akutních myeloidních leukémií (AML). Do čtvrté kategorie jsou řazeny mutace *MPL* W515A, W515R, W515-P518delinsKT, Y591D, A519T, L510P, A506T, T487A, Y252H, S204P, S204F, IVS 11/12 a IVS 10/11 (He *et al.*, 2013). Výše uvedené *MPL* mutace jsou přítomny u 5-10 % pacientů s MF a u 1-4 % pacientů s ET (Beer *et l.*, 2008). Důsledkem mutací v *MPL* genu dochází k nadprodukcí abnormálních megakaryocytů a zvýšené tvorbě krevních destiček.

2.4 Historie PCR

PCR byla poprvé popsána chemikem Karym Mullisem v roce 1983 a patentovaná v roce 1985. Její princip spočívá v „*in vitro*“ amplifikaci specifické nukleotidové sekvence izolované z různých tkání nebo mikroorganismů za použití termostabilní DNA polymerázy. PCR je velmi citlivá metoda. Potřebuje pouze malé množství templátu, aby se naamplifikovalo dostatečné množství kopií cílového úseku. K provedení PCR je zapotřebí templát, primery, nukleotidy, voda, pufr, hořčnaté ionty a enzym termostabilní DNA polymeráza (Garibyan & Avashia, 2013).

PCR reakce se skládá ze tří opakujících se kroků, přičemž se teoreticky počet amplikonů zdvojnásobí při každém cyklu. Prvním krokem je proces denaturace, kdy se reakční roztok zahřeje na teplotu bodu tání dvou komplementárních řetězců cílové DNA a to na 95-98 °C. Komplementární řetězce se tímto oddělí. Vysoká teplota naruší vodíkové vazby mezi nukleotidy řetězců dsDNA, tudíž dvouvláknová DNA je denaturována na jednovláknovou ssDNA. Dalším krokem je „*annealing*“, který se provádí přibližně při teplotě 50-72 °C. Umožňuje navázání specifických primerů. Snížení teploty dovolí reformování vodíkových vazeb a tím i hybridizaci komplementárních vláken (primer- templát). Tohoto kroku se účastní dva primery (*forward*, *reverse*) představující krátké jednovláknové sekvence komplementární k oblastem, které mají být amplifikovány. V posledním kroku zvaném elongace se teplota zvýší na 72 °C. Při této teplotě se

Taq polymeráza váže na 3-konec primeru a katalyzuje polymeraci pomocí deoxyribonukleotid trifosfátů, které jsou přítomny v reakční směsi. Konečným výsledkem je vznik nového vlákna komplementárního k vláknu původnímu. Po vytvoření dvou kopií se cyklus opakuje, přičemž každý cyklus teoreticky zdvojnásobuje množství PCR produktu, které je přítomno v předchozím cyklu (Morley, 2014).

V roce 1983 došlo k vylepšení metody PCR přidáním fluoroforu, který se nespecificky interkaluje do vznikající dvouvláknové struktury. Příkladem je použitím barviva SYBR Green pro relativní kvantifikaci. Další možností je použití fluorescenčně značených sond, které se specificky vážou na DNA s komplementární sekvencí. Absolutní metoda real-time PCR (qRT-PCR) udává konkrétní C_p (angl. *crossing point*), na jehož základě a v porovnání se standardní křivkou se odečítá množství templátu, které je přítomno ve vzorku. Metoda qRT-PCR umožňuje kvantifikaci produktu PCR v reálném čase (Van Guilder *et al.*, 2008).

V roce 1988 Saiki *et al.* poprvé použili termostabilní polymerázu (*Taq* polymerázu) purifikovanou z bakterie *Thermus aquaticus*. Gen lidského β -globinu byl jednou z prvních sekvencí DNA, které byly amplifikovány pomocí PCR.

Koncem roku 1991 byla zavedena metoda „limitního ředění PCR“. Výzkumné skupiny zkoumaly možnost ředění templátové DNA do takové míry, aby každá jednotlivá PCR reakce obsahovala jednu templátovou molekulu. Hlavní výhodou této metody spočívá v tom, že každá molekula DNA je amplifikována samostatně (Dhawan & Dangla, 2019). Tyto experimenty položily základy pro digitální PCR.

V roce 1992 Sykes *et al.* popsali koncept digitální PCR pomocí principu limitního ředění PCR a Poissonovy statistiky ke kvantifikaci celkového počtu vzácných mutací leukemických buněk v populaci buněk normálních.

V roce 1999 byl poprvé použit termín „digitální PCR“ Bertem Vogelsteinem a Kennethem Kinzlerem, kteří vyvinuli technologii pro včasnou diagnostiku somatických mutací spojených s nádorovým onemocněním. Jejich cílem bylo vytvořit citlivou metodu k selektivní amplifikaci mutací s nízkou alelickou náloží. Tato technologie vedla k celkovému vylepšení detekce mutací s malým procentuálním zastoupením oproti klasické PCR nebo *real-time* PCR. Další inovací v současnosti je možnost multiplexování,

což představuje zacílení více alel v rámci jedné PCR zavedením většího množství primerů a fluorescenčních sond do jedné reakce.

V roce 2016 byl společností Stilla Technologies navržen systém, který má vysokou citlivost a přesnost detekce. Vzorek je rozdělen do uzavřených 2D kapičkových krystalů, podle kterých nese název Crystal Digital PCR™ (Dhawan & Dangla, 2019).

2.5 Digitální PCR

Digitální polymerázová řetězová reakce (dPCR) je označována jako polymerázová řetězová reakce třetí generace. Digitální PCR umožňuje absolutní kvantifikaci oproti první generaci PCR, která k analýze produktů využívá gelovou elektroforézu a vyznačuje se nižším detekčním limitem. Druhá generace PCR zvaná jako kvantitativní PCR v reálném čase (RT – PCR) využívá standartních křivek ke kvantifikaci produktů (Mao *et al.*, 2019). V současnosti existují různé platformy dPCR, emulzní či kapková dPCR (ddPCR) a *crystal digital* PCR (cdPCR). Tyto platformy se navzájem mezi sebou liší přístrojovým vybavením, různým způsobem separace vzorků a použitím platformy pro samotnou amplifikaci jako je například olejová emulze či speciálně navržený čip (Váňová *et al.*, 2021).

Digitální PCR zahrnuje několik kroků. Patří sem kompartmentace, PCR amplifikace, detekce a následná kvantifikace. Vzorek se nanese do speciálně navržených čipů nebo destiček, ve kterých se nachází emulzní olej pro tvorbu jednotlivých kapiček. Olej obsahuje biokompatibilní povrchově aktivní látku. Samotné monodisperzní kapičky se tvoří pod tlakem za pomoci vakua v PCR geodě u Stilla Technologies a v případě platformy Biorad v generátoru kapiček, kde se mísí olejová a vodní fáze. Nukleová kyselina (templát) je rovnoměrně distribuovaná mezi kapičky během procesu disperze vzorku. Amplifikace signálu probíhá v každém kompartmentu odděleně za použití fluorescenčních sond a běžných primerů. Kapičky, které jsou pozitivní, obsahují cílový produkt a emitují fluorescenční signál. Skener fluorescence následně analyzuje procento pozitivních kapiček a s využitím Poissonova zákona distribuce určuje absolutní množství pozitivních a negativních kompartmentů (Váňová *et al.*, 2021).

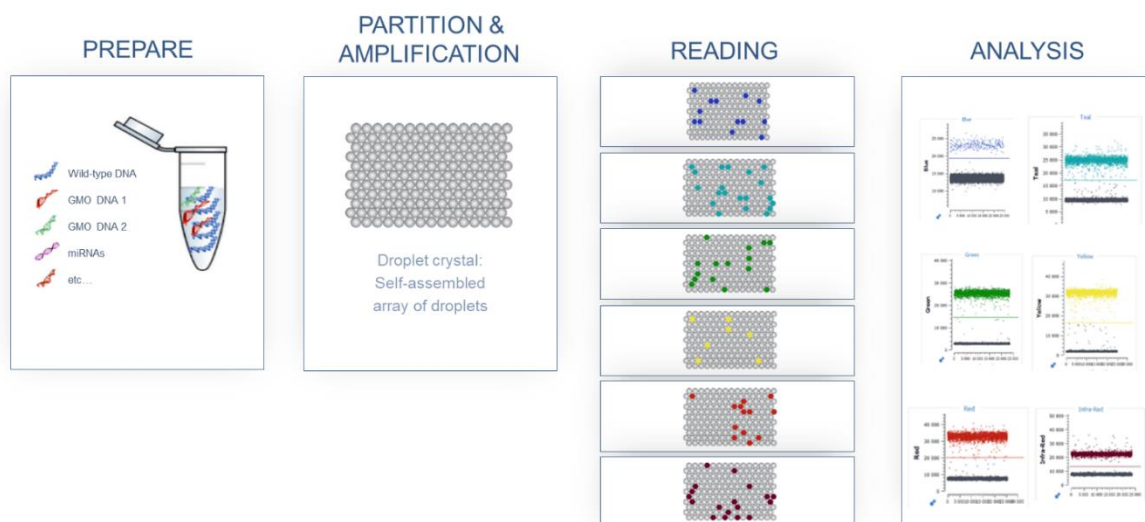
Z digitální PCR je možné získat data dvěma způsoby. Prvním způsobem je sériové čtení známé jako nepřetržitý tok sběru fluorescenčních signálů. Druhým je planární zobrazování, známé jako sbírka fluorescenčních obrázků. Princip sériového čtení je založen na proudu kapiček přes pevný fotonásobič, kde se fluorescenční kapky spočítají. Fluorescenční signál pozitivních kapiček je emitován ve specifických vlnových délkách, které následně zachytí kov-oxidový polovodič či CCD kamera. Planární zobrazení je vhodné pro zpracování dvourozměrných fluorescenčních snímků. Využívají se 3D systémy detekce, které dokážou skenovat sady fluorescenčních kapiček (Hou *et al.*, 2022). Jednotlivé detekční kanály odpovídají fluorescenčním barvivům. Tyto skenery snímají několik fluoroforů a to zejména FAM s excitačním spektrem v oblasti 463- 503 nm a emisním spektrem v oblasti 518- 548 nm. Dále snímají fluorofor HEX s excitačním spektrem v oblasti 514–535 nm a emisním spektrem v oblasti 550-564 nm. Fluorofor CY5 s excitačním spektrem v oblasti nm a emisním spektrem v oblasti nm a fluorofor YAKIMA Yellow s excitačním spektrem v oblasti 562–588 nm a emisním spektrem v oblasti 598-642 nm (Váňová *et al.*, 2021).

Samotné zpracování a analýza dat jsou stejně důležité jako detekční technika. Základním principem je náhodná distribuce nukleových kyselin do objemových kompartmentů, které podléhají PCR odděleně. Je vhodné, aby každý kompartment obsahoval jednu anebo žádnou cílovou sekvenci. Distribuce nukleové kyseliny se řídí Poissonovým rozdělením.

Digitální PCR ve většině případech identifikuje 1 až 2 cíle ve vzorku. Současná detekce dvou nebo více analytů v jedné PCR reakci se označuje jako multiplexování. To hraje významnou roli v oblasti medicinského výzkumu (Hou *et al.*, 2022).

Digitální PCR má mnoho výhod oproti ostatním typům PCR. V konvenčních PCR jsou produkty amplifikace analyzovány gelovou elektroforézou a detekovány fluorescenčním barvením toxickým EtBr. Hlavní výhodou metody dPCR spočívá v absolutní kvantifikaci, která je dosažena bez standardní křivky. Absolutní kvantifikace cílů v klinických vzorcích pomocí dPCR poskytuje vyšší přesnost. Kvantifikace samotná je závislá na logaritmické amplifikaci během každého cyklu PCR. Pokud je amplifikace inhibována, bude kvantifikace nepřesná a může být podhodnocena. Digitální PCR kvantifikuje pomocí koncového bodu místo amplifikace v reálném čase. Je tedy méně ovlivněna přítomností různých inhibitorů ve vzorku a tím i špatnou účinností amplifikace. Tuto metodu lze použít i na vzorky, kde není potřeba extrakce nukleových kyselin. Uplatňuje se v oblasti klinické mikrobiologie

jako je bakteriologie, virologie, mykologie či parazitologie. Na základě laboratorních výsledků testů bylo prokázáno, že metoda dPCR vyniká vysokým detekčním limitem pro kvantifikaci nízké virové nálože, pro monitorování antivirové terapie, pro detekci a kvantifikaci vzácných variant nebo detekci cílů s nízkým i vysokým počtem kopií v reakci (Kuypers & Jerome, 2017).



Obr.č. 2: Schéma zobrazující pracovní postup digitální PCR. Dostupné z <https://www.stillatechnologies.com/multiplex-pcr/digital-pcr-instruments/>

Mezi dostupné technologie digitální PCR patří ddPCR od firmy BIO-RAD s přístrojovým vybavením QX200 AutoDG Droplet. Naica Crystal digital PCRTM od firmy Stilla a QIAcuity One 2plex Device od firmy QIAGEN.

Vůbec první dPCR systém, tzv. *digital droplet* (ddPCR) od firmy BIO-RAD se skládá ze dvou přístrojů, a to generátoru kapek QX200 a skeneru QX200. Nutným dalším přístrojovým vybavením je termocykler pro amplifikaci. Nejprve se před generováním kapiček připraví master mixy se vzorky nukleových kyselin, primery, fluorescenčními sondami. Vzorky jsou následně umístěny do generátoru kapiček a rozdělují vzorek do cca 20 000 kapiček. Vytvořené kapičky mají jednotný objem i velikost. Poté jsou vzorky s kapičkami přeneseny do 96 jamkové destičky a je provedena PCR amplifikace v termocykleru. Po skončení amplifikace jsou kapky z každého vzorku analyzovány ve skeneru fluorescence QX200. Ten analyzuje každou kapičku pomocí šestibarevného detekčního systému. V ddPCR software QuantaSoftTM počítá PCR–pozitivní nebo negativní kapičky pro každý fluorofor ve vzorku. Kapičky, které jsou pozitivní, vykazují fluorescenci oproti negativním (Hindson *et al.*, 2011).

Jednodeskový digitální PCR systém QIAcuity firmy QIAGEN je založený na bázi nanodestiček. Příprava vzorku zahrnuje přenos master mixu se sondami, primery a templátem na 24 nebo 96 jamkovou destičku. Tento digitální PCR systém integruje kompartmentaci, amplifikaci a detekci do jednoho automatizovaného přístroje. Analýza každé kapičky probíhá za pomoci dvoubarevného nebo pětibarevného detekčního systému. Pomocí softwaru QIAcuity Software Suite lze analyzovat koncentraci cílové sekvence na pozitivní a negativní kompartmenty. (Hindson *et al.*, 2013).

Pro provedení PCR firmou Stilla je potřeba přístrojové vybavení Naica Geode (termocykler a vakuová pumpa) a Prism 3/Prism 6 (vícebarevný fluorescenční skener). Reagencie pro PCR zahrnují speciální master mix a v neposlední řadě spotřební čipy (Ruby nebo Sapphire). Systém Naica integruje kompartmentaci a amplifikaci do jednoho přístroje s využitím mikrofluidní technologie. Technologie Crystal Digital PCRTM spočívá v rozdělení vzorků do velkého pole tisíců kapkových krystalů, kdy každý krystal má svůj reakční prostor. Software Crystal Reader měří fluorescenci cílů a poskytuje automatickou identifikaci pozitivních a negativních kapiček pro všech šest fluorescenčních kanálů. Výstupem softwaru Crystal Miner jsou hodnoty absolutní kvantifikace, 1D *scatterplots*, 2D *scatterplots*, 3D *scatterplots*, bodové grafy či histogramy (Netzer *et al.*, 2021). Podrobnější specifikace daných přístrojů viz Tabulka č.1

Tab.č.1: Přehled dostupných technologií digitální PCR

	QX200 firmy BIO-RAD	QIAcuity firmy QIAGEN		Naica Crystal Digital PCR Stilla	
		Nanoplate 26K	Nanoplate 8,5K	Sapphire	RUBY
Počáteční velikost vzorku, μl	20 μ l	40 μ l	12 μ l	25 μ l	5 μ l
Počet kompartmentů	20 000	26 000	8500	30 000	17 000
Kapacita čipu/nanoplates	Mikrotitrační destička, 96 jamek 1-8 vzorků/destičku	8 jamek 24 jamek	24 jamek 96 jamek	4	16
Detekce vzorku	fluorescenční systém	fluorescenční systém		fluorescenční systém	
Počet detekčních kanálů	6	2 nebo 5		3 nebo 6	
Zdroj záření	LED diody	LED diody		LED diody	

2.5.1 Využití a aplikace digitální PCR

Digitální PCR se díky své vysoké citlivosti a přesnosti uplatnila v různých oblastech využití např. v klinické a prenatální diagnostice, mikrobiologii, monitorování životního prostředí, testování potravin a vody, zemědělství či v medicínském výzkumu. V medicíně se dPCR využívá zejména v oblasti onkologie (Ling Tan *et al.*, 2023).

Metodu digitální PCR lze využít k přesné kvantifikaci nukleových kyselin v potravinářství, zemědělství, analýze vodních systémů nebo testování GMO (angl. *Genetically modified organism*). Standardem pro detekci a kvantifikaci GMO je kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR). Tato metoda má své nevýhody, např. citlivost na přítomnost inhibitorů a nutnost standardní křivky pro kvantifikaci. Vysoké koncentrace potenciálních inhibitorů v qPCR vyžadují použití více zředěných vzorků, což má dopad na kvantifikaci GMO ve složitých maticích. Sykes *et al.* v roce 1992 využili metodu dPCR pro detekci GMO v potravinách obsahujících sóju. V porovnání s kvantitativní PCR (qPCR), má dPCR větší odolnost vůči inhibičním látkám, které mohou být přítomny v komplexních vzorcích, jako jsou potravinářské vzorky nebo vzorky půdy. To znamená, že dPCR může poskytnout přesnější a spolehlivější výsledky kvantifikace GMO v takových vzorcích (Bogožalec Košir *et al.*, 2019).

K léčbě některých genetických onemocnění se používá buněčná a genová terapie. Jejich cílem je nahrazení nebo umlčení funkce cílového genu, jehož funkce buď zcela chybí nebo je patologická. Genové terapie jsou aplikovány „*in vivo*“, s využitím adeno – sociovaných nebo retrovirových vektorů. Digitální PCR se v této oblasti uplatňuje ke kvantifikaci a analýze virových vektorů. Příkladem jsou integrační vektory, které umožňují dlouhodobou expresi transgenu při léčbě hematopoetických malignit. Inzerce genu do kmenových či progenitorových buněk vede ke stabilní modifikaci hematopoetických linií. Metoda dPCR stanovuje variabilitu počtu kopií vektoru (CNV) v cílových buněčných populacích (Huan-Ting Lin *et al.*, 2016).

Digitální PCR se také stala efektivním nástrojem v laboratoři klinické mikrobiologie, kde dříve dominovala kvantitativní PCR. Je užitečná pro stanovení zátěže patogeny; zejména pro detekci bakteriálních a virových patogenů. Digitální PCR byla použita ke stanovení počtu kopií DNA a RNA virů, bakterií a parazitů v různých klinických vzorcích. Testy se využívají ke kvantifikaci virů hepatitidy B, C a D a lidských rhinovirů, viru. Bakterie jako

je *Mycobacterium tuberculosis* a *Helicobacter pylori* je možné detekovat s vysokou spolehlivostí. Dalším přínosem metody dPCR je spolehlivá charakterizace referenčních vzorků, detekce málo frekvenčních mutací a vzácných alelických cílů v bakteriálních kmenech. Příkladem je kvantifikace HIV (angl. *Human Immunodeficiency Virus*) a HPV (angl. *Human Papillomavirus*) v latentních virových rezervoárech (Kuypers & Jerome, 2017), detekce SARS-CoV-2 či stanovení přítomnosti mikrobiálních patogenů v oblasti bezpečnosti potravin. Při detekci HIV ve vzorcích periferní krve prokázala dPCR své výhody oproti původně používané qPCR. Testování virové nálože je standardním klinickým nástrojem k posouzení rychlosti progresu virového onemocnění. Metoda dPCR je důležitá pro výzkum latentního rezervoáru HIV a je vysoce přesná při měření HIV v klinických vzorcích.

Tyto vlastnosti činí digitální PCR užitečnou pro klinické studie zaměřené na eradikaci HIV u infikovaných pacientů (Strain *et al.*, 2013). Ve srovnání s metodou qPCR, dPCR umožňuje přesnější detekci COVID-19. Digitální PCR je účinná zejména při detekci viru SARS-CoV19 u asymptomatických pacientů. Včasná diagnóza vede k identifikaci a kontrole šíření infekce (Lu *et al.*, 2020).

Postupem času byla dPCR aplikována na identifikaci a kvantifikaci volné cirkulující DNA dárce (dd-cfDNA) jako biomarker pro monitorování úspěšnosti transplantací orgánů. Použitím minimálně invazivní tekuté biopsie může být u příjemců transplantátu monitorována hladina dárcovských buněk, a to z důvodu potenciální rejekce orgánu či štěpu. Oblast alogenní transplantace hematopoetických buněk (allo-HSCT) slouží jako kurativní terapie u pacientů s akutními leukémiemi, myelodysplastickým syndromem. Hlavním klinickým problémem je častý výskyt relapsu základního onemocnění po allo-HSCT. Z tohoto důvodu je důležitá včasná identifikace pacientů s vysokým rizikem relapsu. Metoda dPCR je směřována ke stanovení hladiny buněčného chimerismu u transplantovaných pacientů. Cílem je detekce účinnosti alogenní transplantace. Stahl *et al.*, v roce 2013 využili metodu dPCR k detekci polymorfismů a sekvence chromozomu Y. Metoda dPCR byla porovnána s metodou qPCR a analýzou krátkých tandemových repetitivních sekvencí pomocí fragmentační analýzy (STR analysis). Ve vzorcích pacientů vykazovala dPCR větší citlivost a přesnější kvantifikaci hladiny chimerismu proti ostatním použitým metodám. Všechny metody pro analýzu chimerismu jsou založeny na detekci genetických rozdílů mezi příjemcem

a dárcem. Waterhouse *et al.*, v roce 2016 využili metodu dPCR k monitorování chimerismu a stavu molekulární remise u transplantovaných pacientů (Coccaro *et al.*, 2020).

Digitální PCR slouží k analýze onkologických biomarkerů, jejichž zdrojem může být krevní plazma. V té se nachází cirkulující volná DNA (cfDNA), jejíž součástí je i frakce volné nádorové DNA (ctDNA). Tekuté biopsie představují minimálně invazivní přístup při odběru vzorků. Digitální PCR se využívá pro detekci somatických mutací především v diagnostice akutních myeloidních leukémií (AML), byla aplikována i v oblasti lymfomů. Příkladem je klasický Hodgkinův lymfom, při kterém se v lymfatickém systému tvoří maligní Hodgkinovy a Reed - Sternbergovy buňky nesoucí mutace především v genu pro exportin (XPO1) a STAT6 (Kuppers *et al.*, 2012, Bräuninger *et al.*, 2012). Digitální PCR se osvědčila u diagnostiky Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií, jako je PV, ET, MF. Tato onemocnění jsou spojena s mutacemi řídicích genů jako je JAK2, MPL nebo CALR (Coccaro *et al.*, 2020). Mimo jiné je dPCR vhodná i pro diagnostiku Waldenströmovy makroglobulinémie (WM), u níž se vyskytuje mutace L265P v genu *MYD88*. Mutace v *MYD88* se vyskytují u mnoha lymfoidních malignit, např. u difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL), kožního difúzního velkobuněčného B-lymfomu (CBCL) a primárního lymfomu centrálního nervového systému (PCNSL). Tento gen kóduje cytosolický adaptorový protein, který hraje roli ve vrozené a adaptivní imunitní reakci.

Oblast neinvazivní prenatální diagnostiky, konkrétně analýza fetálních cirkulujících nukleových kyselin (cffDNA – cell free fetal DNA) v krvi matky, je dalším příkladem využití této technologie. Metoda umožňuje detekci vzácných mutací plodu a placentárních buněk. Základem je neinvazivní detekce chromosomálních aneuploidií plodu způsobující základní syndromy, Downův, Patauův, Edwardsův či Turnerův. Metoda dPCR je na základě detekce CNV u STR lokusů vázaných na čtyři základní chromozomy (13, 18, 21, X) schopna detekovat jejich aneuploidie. Nižší frakce fetální DNA v plazmě matky vedou k nutnosti navýšení počtu vyšetřovaných molekul. Digitální PCR v oblasti detekce fetálních aneuploidií představuje časově i nákladově efektivní nástroj pro včasnou diagnostiku syndromů. Příkladem je detekce X-vázaných chorob či trizomie 21 (Hudecova 2015), (Lun *et al.*, 2008), (Tsui *et al.*, 2011), (Barrett *et al.*, 2012).

Digitální PCR je také hojně využívána pro genotypizace, analýzu CNV (angl. *copy number variation*) nebo jako validační nástroj pro potvrzení dat získaných jinými technologiemi, například metoda NGS (angl. *Next Generation Sequencing*). Příkladem mohou být experimenty týkající se alternativních sestřihových variant či analýza metylace DNA. Methylace DNA byla zkoumána v souvislosti se studií různých typů nádorů. (Robin *et al.*, 2016).

3. Experimentální část práce

3.1 Soubor pacientů

V experimentální části práce byla použita DNA izolovaná ze vzorků kostní dřeně i periferní krve pacientů léčených na HOK FN Olomouc s diagnózou Ph–negativní myeloproliferativní neoplázie. Jako negativní kontrola byla použita DNA izolovaná ze vzorků periferní krve zdravých dárců. Soubor tvořilo 22 pacientů s erytrocytózou NS, u nichž v době diagnózy nebyla prokázána mutace v *JAK2* V617F ani mutace v exonu 12. Soubor tvořilo 15 mužů a 7 žen s mediánem věku 52 let při diagnóze.

Veškeré experimenty byly prováděny retrospektivně. U všech pacientů bylo provedeno základní diagnostické vyšetření (stanovení imunofenotypu, karyotypu a následně přítomnost základních mutací *JAK2*, *BCR/ABL*, *CALR*, *MPL* podle doporučení ELN 2022). Pacienti podepsali informovaný souhlas s odběrem, genetickým vyšetřením a uchováním biologického materiálu s následným využitím pro vědecké účely schválený etickým kodexem Světové zdravotnické asociace (WMA-The World Medical Association).

3.2 Materiál a příslušenství

3.2.1 Přístroje

- zařízení na úpravu ultračisté a reverzně osmotické vody
- centrifuga vysokorychlostní
- stolní centrifuga
- jednokanálové pipety
- mrazicí boxy (-80 °C, -20 °C)
- ledničky (4-8 °C)
- kývačka
- heat blok
- spektrofotometr
- termostat 37 °C
- Naica[®] Stilla cdPCR systém

3.2.2 Laboratorní materiál

- špičky s filtrem
- jednorázové plastové pipety s filtrem - 5 ml a 10 ml
- kónické plastové zkumavky centrifugační - 15 ml a 50 ml
- mikrozukavky - 0,2 ml a 1,5 ml
- plastové Pasteurovy pipety - 1 ml a 3 ml
- Nitrilové ochranné rukavice
- Savo, 10 x ředěný roztok
- Sapphire chips
- Staticide wipes (antistatické ubrousky)

3.2.3 Komerčně dostupné chemikálie a roztoky

- Naica Multiplex PCR master mix
- Reverzně osmotická a ultračistá voda ze systému Direct-Q 3UV (Millipore)
- specifické primery a TaqMan sondy (LNA) pro detekci dané mutace

Tab.č.2: Sekvence primerů a sond pro detekci mutace W515K, W515L, S505N v genu *MPL* a pro detekci WT alely pomocí dPCR.

	Sekvence	Fluorescenční kanál
Primer <i>MPL</i> F	5-3'TAGCCTGGATCTCCTTGGTG	-
Primer <i>MPL</i> R	5-3'ACAGAGCGAACCAAGAATGC	-
W515K proba	5-3'TGCTGCTGAGGAAGCAGTTTCC-BHQ1	FAM (modrá)
W515L proba	5-3'CTGCTGAGGTTGCAGTTTC-BHQ1	CY5 (červená)
S505N proba	5-3'TGCTGGGCCTCAACGCCGTCCT	YY (modrozelená)
W515 proba	5-3'CTGCTGAGGTGGCAGTTTC-BHQ1	FAM (modrá)
S505 proba	5-3'TGCTGGGCCTCAGCGCCGTCCT	ROX (žlutá)

Tab.č.3: Sekvence primerů a sond pro detekci mutace F537_K539L, N542_E543del, E543_D544del, H538_K539QLv genu *JAK2* a pro detekci WT alely pomocí dPCR.

	Sekvence	Fluorescenční kanál
Primer <i>JAK2</i> F	5-3'TCTGATGTACCAACCTCACCA	-
Primer <i>JAK2</i> R	5-3'GACAGTAATGAGTATCTAATGAC	-
F537_K539L proba	5-3'CAAATGGTGTTAATCAGAA	CY5 (červená)
N542_E543del proba	5-3'CACAAAATCAGAGATTTGATA	ROX (žlutá)
E543_D544del proba	5-3'AATCAGAAATTTGATAT	HEX (zelená)
H538_K539QL proba	5-3'TGGTGTTTCAATTAATCAGAAATG	YY (modrozelená)
WT proba	5-3'TGGTGTTTCACAAAATCAGAA	FAM (modrá)

3.3 Metody

3.3.1 Digitální PCR od firmy Naica® system (Stilla Technologies)

Systém Naica® je platformou digitální PCR využívající mikrofluidní technologii. Technologie Crystal Digital PCR™ rozděljuje vzorky do pole tisíců kapkových krystalů, kde každý krystal má svůj reakční prostor, ve kterém dochází k amplifikaci cílových molekul. Reakční oddíly jsou vyhodnocovány pomocí detekčního zařízení, které ve vybraných detekčních kanálech snímá fluorescenci. Software Crystal Miner počítá koncentraci cílových sekvencí a poskytuje automatickou identifikaci pozitivních a negativních kapiček pro všechny fluorescenční kanály. Systém Naica® se skládá z Naica Geode (automatický generátor kapiček a termocykler) a Prism6 (skener fluorescence) se softwary Crystal Reader a Crystal Miner.

3.3.2 Komerčně dostupné reakční směsi, oligonukleotidy a sondy pro dPCR

Pro analýzu systémem Naica® Crystal Digital PCR™ jsou využívány komerční kity. První obsahuje EvaGreen® a druhý je pro Taq Man sondy (Naica Multiplex PCR mix). EvaGreen je zelené fluorescenční barvivo vázající se na dsDNA. Námi používaný komerční kit

Naica multiplex PCR mix je speciálně vyráběn pro Crystal Digital PCR® s využitím fluorescenčních sond typu TaqMan. Tyto dvousložkové reakční směsi jsou složeny z reagensů Buffer A a Buffer B. Buffer A obsahuje kompletní mix složek pro PCR včetně DNA polymerázy a referenčního barviva fluoresceinu. Buffer B obsahuje ionty.

Dále jsou potřeba speciálně navržené oligonukleotidy (primer F+R, sondy) k detekci mutací v genech *MPL* a *JAK2* viz Tabulka č. 2 a č. 3. Jako templát byla využita DNA izolovaná z leukocytů periferní krve pacientů. Jako negativní kontroly byly použity DNA izolované ze vzorků krve zdravých dárců. Komerčně syntetizované fragmenty, gBlocks™ Gene Fragment (ITD), slouží jako homozygotní pozitivní kontrola pro danou mutaci. Pro kontrolu kontaminace byla využita reverzně osmotická a ultračistá voda ze systému MiliQ (NTC).

3.4 Postup

1. Přístrojem NanoDrop byla provedena kontrola koncentrace, kvality a čistoty izolované DNA.
2. Restrikce DNA pomocí Eco RV viz Tabulka č. 4.

Tab.č.4: Příprava master mixu pro restrikci

Reagencie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace
Voda	-	Do 50 µl
HF purf	10x	5
Eco RV HF	20,000 units/ml	1 U/reakce
DNA	~100 ng/µl	1 µg

3. Reakční složky byly rozmrazeny při laboratorní teplotě a promíchány.
4. Pro každou reakci byl připraven Master Mix viz Tabulka č. 5, 6.

Tab.č.5: Příprava reakční směsi pro detekci mutací v genu *JAK2* pomocí dPCR.

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 vzorek [l]
Buffer A	5x	1x	5
Buffer B	25x	1x	1
Voda (NTC)	-	-	10,5
Primer F	6,25 μ M	300 nM	1,2
Primer R	6,25 μ M	300 nM	1,2
Proba WT+MUT	6,25 μ M	250 nM	1
Templát	200 ng		5

Tab.č.6: Příprava reakční směsi pro detekci mutací v genu *MPL* pomocí dPCR.

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 vzorek [l]
Buffer A	5x	1x	5
Buffer B	25x	1x	1
Voda (NTC)	-	-	6
Primer F	25 μ M	1 nM	1
Primer R	25 μ M	1 nM	1
Proba WT+MUT	6,25 μ M	500 nM	2+2
Templát	200 ng	-	2

5. Reakční směs byla rozpipetována do 0,2 ml zkumavek po 23 μ l.
6. Připipetovány byly 2 μ l templátu (vzorky pacientů, pozitivní/negativní kontrola) nebo 2 μ l NTC.
7. Reakční směs byla promíchána pipetou a zcentrifugována.
8. Výsledný reakční objem činil 25 μ l.
9. Do jednotlivých jamek (4 jamky na 1 čip) na povrch olejové vrstvy bylo napipetováno 25 μ l reakční směsi.
10. Jamky byly uzavřeny.
11. Byla zapnuta tlaková pumpa na tlak 120 ± 50 mBarrs, která je napojena na Naica Geode (automatický generátor kapiček a termocykler).
12. Spodní strana čipu byla ošetřena antistatickým ubrouskem.
13. Ošetřené čipy byly vloženy do Naica Geode a byl spuštěn program, který je uveden v Tabulce č. 7, 8, 9.

Tab.č.7: Teplotní profil PCR (Naica Geode)

Teplota	Čas	Počet cyklů	Název kroku
40°C	12 minut	1x	dělení vzorku
95°C	10 min	1x	počáteční denaturace/ aktivace polymerázy
95°C	30 s	40-45x	polymerizace
variable	30-60 s		
↓25°C	33 minut	1x	uvolnění tlaku termocykleru a vytvoření kapiček
4°C	∞	1x	chlazení

Tab.č.8: Teplotní profil reakce pro detekci mutací v genu *JAK2* pomocí dPCR.

Teplota	Čas	Počet cyklů	Název kroku
95°C	10 min	1x	počáteční denaturace/ aktivace polymerázy
95°C	30 s	45x	denaturace
55°C	45 min	45x	annealing/extenze

Tab.č.9: Teplotní profil reakce pro detekci mutací v genu *MPL* pomocí dPCR.

Teplota	Čas	Počet cyklů	Název kroku
95°C	10 min	1x	počáteční denaturace/ aktivace polymerázy
95°C	30 s	45x	denaturace
54°C	15 min	45x	annealing
72°C	30 min	45x	extenze

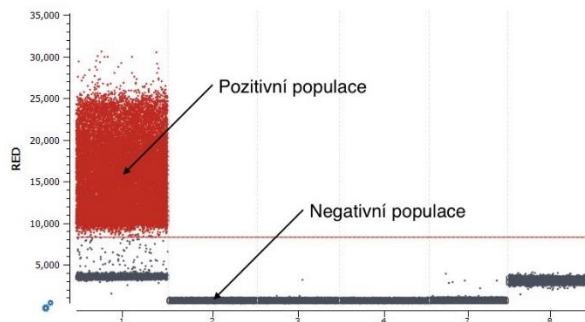
14. Po skončení PCR amplifikace byly čipy z Naica Geody vloženy do speciálního rámečku.
15. Rámeček byl vložen do Prism6 readeru.
16. V programu Crystal Reader Software byly nastaveny parametry pro skenování fluorescence a bylo spuštěno skenování.
17. Výsledná analýza dat probíhala v programu Crystal Miner Software.

4. Výsledky

4.1 Kompenzace dPCR

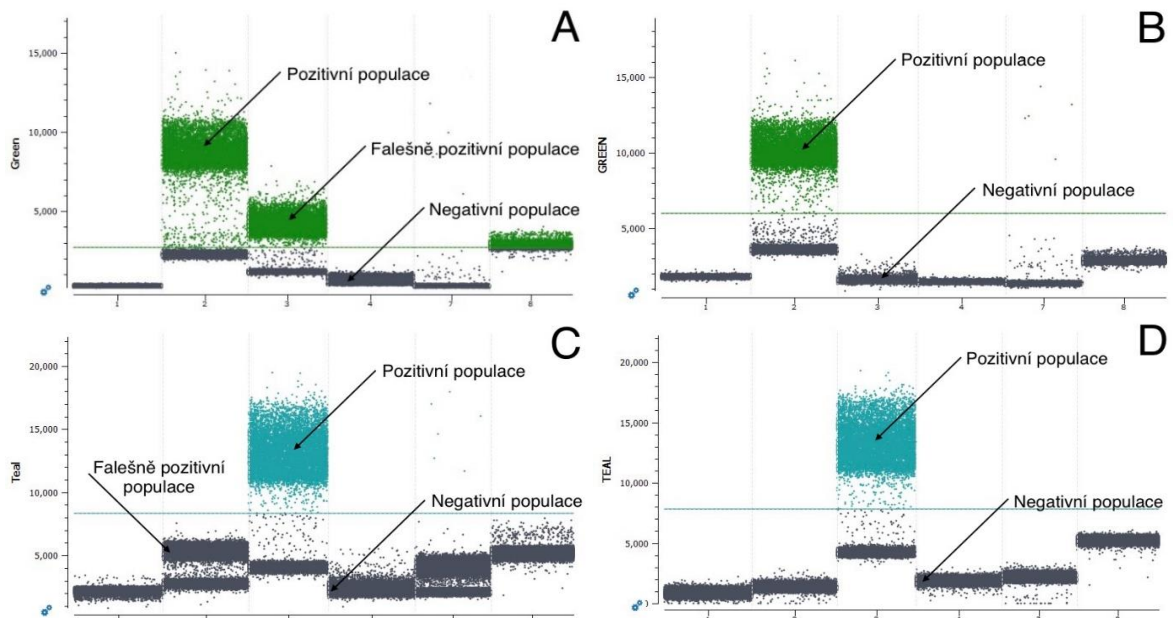
Digitalní PCR od firmy Stilla umožňuje multiplexování s šesti různými fluorescenčními fluorofory. Signál z některých fluoroforů může být detekován ve více než jednom detekčním kanálu. Tento jev je označován jako přelévání fluorescence neboli přesvit. Z tohoto důvodu bylo nutné vytvořit kompenzační matici pro každý detekční kanál zvlášť. Kompenzace byla využita při detekci mutací v genu *JAK2* i *MPL* u pacientů s Ph-negativním myeloproliferativním onemocněním typu PV, PMF a ET. Experiment byl proveden s homozygotními kontrolami pro konkrétní variantu a danou sondou se specifickým fluoroforem (tzv. *monocolor* reakce). Výsledkem jsou grafy (1D, 2D, 3D) popisující na ose y intenzitu fluorescence v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU angl. *Relative fluorescence units*) v jednotlivých vzorcích (osa x). Na obrázcích č. 3 a 4 je vidět 1D bodový graf, který rozlišuje pozitivní a negativní populaci.

Obrázek č. 3 znázorňuje nekompenzovaná data, kde je vidět fluorescenčně pozitivní populace (červená) oddělená od fluorescenčně negativních kapiček (tmavě šedá). Mezi těmito populacemi jsou přítomny kompartmenty, které jsou rozptýlené mezi pozitivními a negativními populacemi a mají střední hodnoty fluorescence. Tyto kompartmenty nazýváme jako „rain“, který může ztížit nastavení adekvátního prahu tzv. „*thresholdu*“ hodnot pro fluorescenci mezi pozitivní a negativní populací. „*Rain*“ může vznikat důsledkem použití degradovaného templátu, nehomogenní distribucí fluorescence, chybou polymerázy či vytvořením dimerů primerů.



Obr. č.3: Na 1D grafu je *scatterplot* znázorňující nekompenzovaná data

Na obrázku č. 4A, v jamce číslo 2 jsou signály z reálně přítomné mutace (zelená populace). V jamce číslo 3 dochází k přesvitu modrozelené sondy do zeleného detekčního fluorescenčního kanálu. Tento přesvit představuje falešně pozitivní zelenou populaci. Na obrázku č. 4B byla po kompenzaci falešně pozitivní zelená populace v jamce číslo 3 odstraněna. Na obrázku č. 4C vidíme v jamce číslo 3 fluorescenčně pozitivní populaci (modrozelená) oddělenou od fluorescenčně negativní populace (tmavě šedá). Dále pozorujeme v jamce číslo 2 přesvit zelené sondy do modrozeleného detekčního fluorescenčního kanálu. Přesvit tvoří dvě populace místo jedné populace negativní. Po aplikaci kompenzační matice na obrázku č. 4D, falešně pozitivní populace v jamce číslo 2 zmizela.



Obr.č. 4: Na 1D grafu A, B, C, D jsou *scatterploty* znázorňující nekompenzovaná data a data po kompenzaci

4.2 Optimalizace dPCR

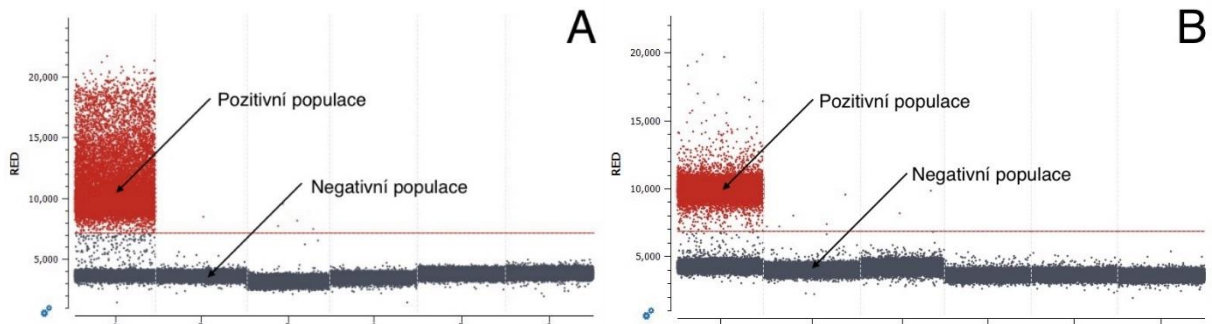
Cílem optimalizace je dosáhnout co nejvyšší citlivosti detekce cílové sekvence a minimalizovat nespecifickou amplifikaci. Tím se zajistí spolehlivá detekce a kvantifikace cílových molekul v analyzovaném vzorku.

Neoptimální nastavení dPCR vede k nedostatečnému rozdělení negativních a pozitivních populací. To se nazývá jako „*rain*“, který znemožňuje jednoznačné nastavení „*thresholdu*“ pro hodnoty fluorescence. Minimalizovat tento jev lze optimalizací dPCR.

Jedním z příkladů optimalizace může být zvýšení počtu cyklů či zvýšení teploty *annealingu*, která je příliš nízká a umožňuje nespecifickou amplifikaci. Zvýšení počtu cyklů může pomoci zvýšit fluorescenční signál molekul se středními hodnotami fluorescence. V případě analýzy vzácných mutací může vyšší počet cyklů zvýšit šanci zachycení nízc zastoupených alel v analyzovaném vzorku. Optimalizace počtu cyklů může pomoci dosáhnout vyššího výtěžku amplifikace a zlepšit tak lineární rozsah kvantifikace. Přítomnost inhibitorů v DNA vzorcích může také narušit efektivitu amplifikace a vést k nepřesným nebo dokonce nesprávným výsledkům kvantifikace pomocí dPCR. Všechny tyto faktory je třeba zohlednit při plánování a provádění experimentů. Vhodně navržené primery a sondy jsou zásadní pro úspěšnou a spolehlivou analýzu. Nevhodně navržené mohou vést k nespecifické amplifikaci, která může zkreslit výsledky analýzy. Na obrázcích č. 5, 6 a 7 vidíme 1D bodové grafy, znázorňující fluorescenčně pozitivní a fluorescenčně negativní populace. V experimentu byly použity všechny sondy, které byly součástí master mixu, dále homozygotní pozitivní kontrola pro danou mutaci. Teplota *annealingu* byla nastavena nejprve na 52 a poté na 54°C.

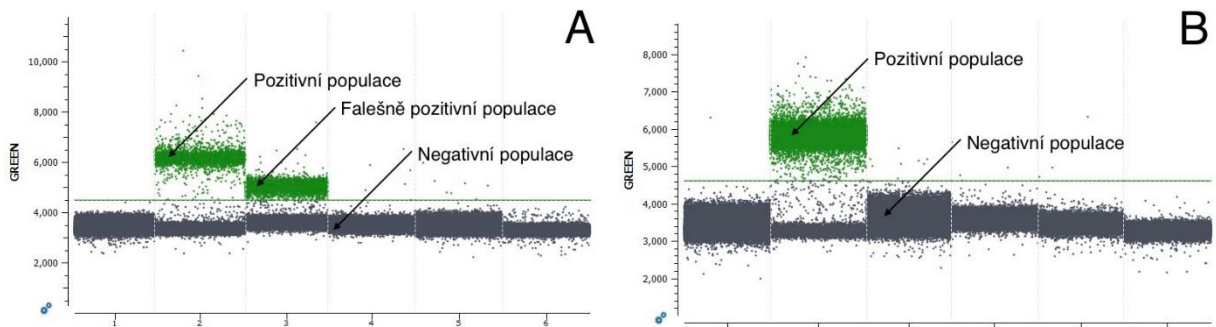
Obrázek č. 5A znázorňuje data po aplikaci kompenzační matice a nastavení teploty PCR na 52°C. Vidíme fluorescenčně pozitivní populaci (červená) oddělenou od fluorescenčně negativní populace (tmavě šedá). Při teplotě 52°C u pozitivní populace pozorujeme široký rozptyl intenzity fluorescence. Široký pás fluorescence ztěžuje interpretaci výsledků a může vést k nepřesným kvantifikacím cílových molekul. Tento fluorescenční pás může být příčinou přítomnosti nežádoucích nebo nespecifických produktů amplifikace. To může být způsobeno nevhodným navržením primerů a sond, nerovnoměrnou distribucí cílových molekul v reakční směsi či nerovnoměrným rozložením vzorků v mikroreaktorech, které vede k variabilitě v koncentraci cílových molekul

mezi jednotlivými reakcemi. Na obrázku č. 5B, po zvýšení teploty na 54°C došlo k eliminaci nespecifického signálu a pozitivní populace (červená) se zaostřila.



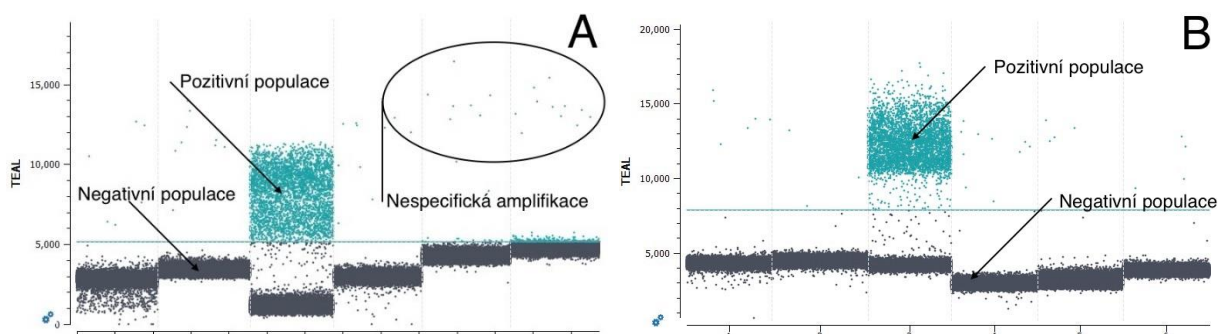
Obr.č. 5: Na 1D grafu A, B jsou *scatterploty* znázorňující data po aplikaci kompenzační matice a nastavení teploty PCR na 52°C a 54°C.

Na obrázku č. 6A pozorujeme v jamce číslo 2 fluorescenčně pozitivní populaci (zelená). Dále vidíme v jamce číslo 3 přesvit modrozelené sondy do zeleného detekčního fluorescenčního kanálu. Přesvit tvoří falešně pozitivní zelenou populaci. Následkem zvýšení teploty na 54°C došlo k odstranění falešně pozitivní populace v jamce číslo 3 viz obr. č. 6B.



Obr.č. 6: Na 1D grafu A, B jsou *scatterploty* znázorňující data po aplikaci kompenzační matice a nastavení teploty PCR na 52°C a 54°C.

Na obrázku č. 7A vidíme fluorescenčně pozitivní populaci (modrozelená). Při teplotě 52°C u pozitivní populace pozorujeme široký rozptyl intenzit fluorescence, který se na obrázku č. 7B po zvýšení teploty na 54°C zúžil. Dále na obrázku č. 7A v jamce č. 1, 2, 4, 5, pozorujeme přítomnost nespecifické amplifikace, která byla zvýšením teploty na 54°C na obrázku č. 7B snížena. Změna teploty eliminuje nežádoucí nespecifickou amplifikaci.



Obr.č. 7: Na 1D grafu A, B jsou *scatterploty* znázorňující data po aplikaci kompenzační matice a nastavení teploty PCR z 52°C na 54°C.

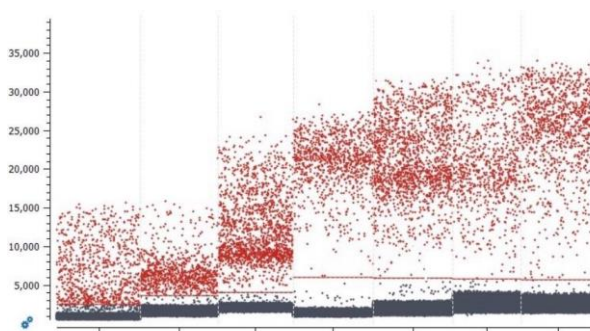
4.3 Stanovení optimální koncentrace sondy

Optimální koncentrace sondy je nezbytná pro dosažení optimálního poměru mezi citlivostí a specificitou detekce cílových sekvencí. Příliš nízká koncentrace oligonukleotidů může vést k nedostatečnému fluorescenčnímu signálu, zatímco příliš vysoká koncentrace může způsobit nežádoucí nespecifické vazby např. dimery primer-primer či primer sonda. Optimální koncentrace sondy dále zajišťuje lineární odezvu mezi počtem kopií cílové sekvence a signálem detekce. Tím se minimalizuje pozadí signálu a snižuje se šum. Správně stanovená koncentrace sondy může vést k úspoře nákladů na reagentie a minimalizuje spotřebu vzácných vzorků. Optimální koncentrace sondy je klíčová pro zajištění přesných, citlivých a reprodukovatelných výsledků digitální PCR.

Proces stanovení optimální koncentrace sondy zahrnuje provedení koncentrační řady. Tento krok je klíčový z několika důvodů. Koncentrační řada umožňuje získat data o lineární odezvě závislosti RFU na koncentraci sondy. Prostřednictvím koncentrační řady lze identifikovat bod, kde je dosaženo optimálního poměru mezi citlivostí a specificitou detekce. Tím se minimalizuje riziko nežádoucích nespecifických reakcí a zajišťuje se maximální detekce cílových sekvencí. Opakované provedení ředící řady navíc potvrzuje reprodukovatelnost výsledků a zajišťuje eliminaci případných experimentálních chyb.

V našem experimentu byla provedena ředící řada sondy MPL W515L v rozmezí koncentrace 60–1000 nM (60/125/180/250/500/750/1000 nM). Na obrázku č. 8 ve vzorku č. 5, 6 a 7 pozorujeme nerovnoměrnou distribuci cílových molekul v reakční směsi. To může být způsobeno příliš vysokou koncentrací sondy. Nadměrná koncentrace sondy v master mixu může vést k nerovnoměrné distribuci cílových molekul mezi jednotlivými kapkami/krystaly. Příliš vysoká koncentrace sondy také může inhibovat polymerázovou

reakci, která je klíčová pro amplifikaci cílových molekul. Naopak nízká koncentrace sond (Obr. č. 8, vzorek č. 1,2 a 3) může způsobit slabý signál, protože sondy pro PCR je v roztoku omezené množství a detekce fluorescenčního signálu není dostatečná. Pokud nejsou cílové molekuly dostatečně detekovány, existuje riziko falešně negativních výsledků. Nedostatečná koncentrace sondy může ovlivnit lineární odezvu mezi počtem kopií cílových molekul a signálem detekce. Z výsledků můžeme říci, že ideální koncentrace sondy je 250 nM (Obr. č. 8, vzorek č.4). Pozitivní kompartmenty mají vysokou hladinu fluorescence (20 000 RFU) a populace pozitivní a negativní jsou velmi dobře separované.



Obr.č. 8: 1D scatterplot znázorňující koncentrace sondy MPL W515L (60/125/180/250/500/750/1000 nM)

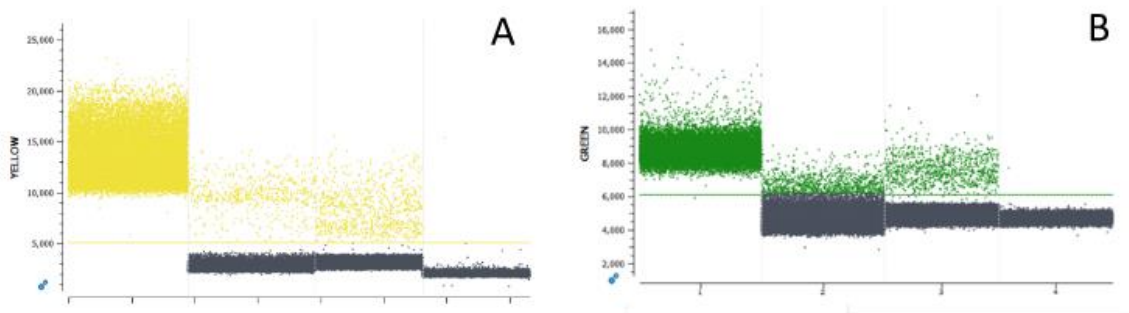
4.4 Vliv stavu templátu na PCR

Určité faktory mohou ovlivnit účinnost kvantifikace. Štěpení DNA restrikcími enzymy ovlivňuje dostupnost cílových molekul při amplifikaci. Nerovnoměrná distribuce neštěpeného vstupního templátu může způsobit nepřesnosti ve výsledcích. Je tedy nutné brát v úvahu efektivitu amplifikace, která se může lišit dle počátečního stavu templátu. Kratší fragmenty se amplifikují lépe než ty delší. Pravděpodobnost, že se celá molekula DNA chromozomu (řádově Mb) do krystalu dostane, je menší než přítomnost štěpeného templátu o výrazně kratších délkách.

Experiment byl proveden s pozitivními kontrolami pro konkrétní mutaci v exonu 12 genu *JAK2* a vzorky DNA izolovanými z patientských vzorků. Účinnost PCR byla srovnána u vzorků DNA neštěpených a těch, které byly štěpeny pomocí *EcoRV*. Pro kontrolu byly sledovány i WT alely.

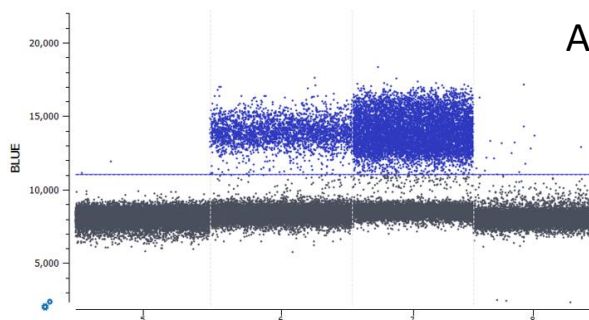
Obrázek č. 9 znázorňuje experiment sledující účinnost PCR v závislosti na stavu templátu. Je zde použita neštěpená i štěpená DNA izolovaná z patientského vzorku obsahující mutaci p.E543_D544del (Obr. č. 9A). Obrázek č. 9B znázorňuje data

z patientských vzorků obsahujících mutaci p.N542_E543del. Při použití neštěpené DNA (Obr. č. 9A vz. č. 2 a 9B vz. č. 2) pozorujeme nižší procentuální zastoupení pozitivních krystalů. Na obrázku č. 9A, vzorek č.3 a 9B, vzorek č. 3 při použití štěpené DNA došlo k lepší amplifikaci templářů a zastoupení pozitivních krystalů je vyšší.



Obr.č. 9: Na 1D grafu A, B jsou *scatterplots* znázorňující data při použití neštěpené DNA (Graf 9A vz. 2 a 9B vz. 2) a štěpené DNA (Graf 9A vz. 3 a 9B vz 3).

Obrázek č. 10A znázorňuje data, kde byla sledována WT alela sloužící jako referenční hodnota. Ve vzorku 1 na obrázku č. 10A je pozitivní kontrola pro danou mutaci v homozygotní formě. WT alela se zde neamplifikuje. Ve vzorcích č. 2 (neštěpený templát) a č. 3 (štěpený templát) je vidět výrazně vyšší účinnost amplifikace ve štěpeném vzorku. Počet pozitivních modrých signálů (WT alela) je dvojnásobný.



Obr.č.10: Na 1D grafu A je *scatterplot* znázorňující data při použití WT alely sloužící jako referenční hodnota pro porovnání s mutovanými formami genu

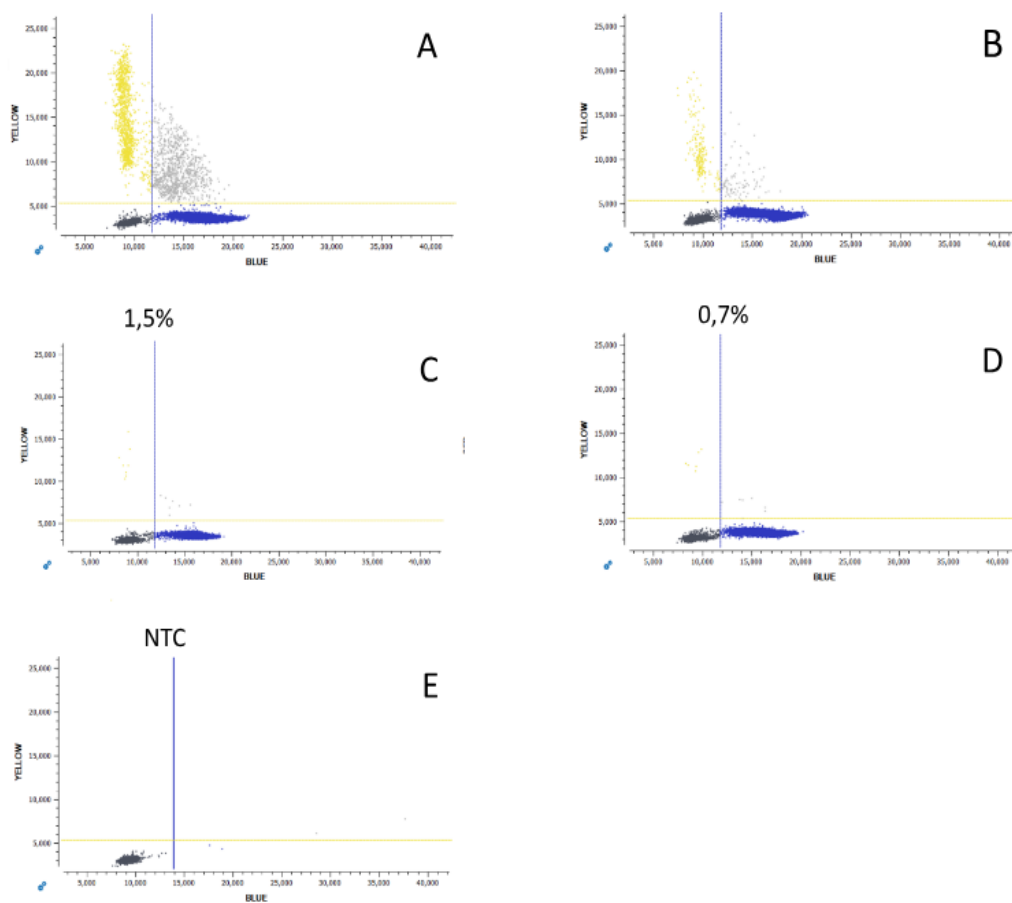
Z výsledků experimentů je patrné, že DNA, která byla předem štěpena restrikním enzymem *EcoRV* umožňuje lépe definovat cílové oblasti a zajišťuje konzistentní výsledky. Dále tento postup může odstranit potenciální problémy s nerovnoměrným rozdělením fragmentů DNA. Navíc štěpení DNA může snížit pravděpodobnost vzniku nežádoucích struktur jako jsou sekundární interakce (vlásenky), které by mohly ovlivnit amplifikaci.

4.5 Koncentrační řada pozitivních kontrol

Vytvoření koncentrační řady umožňuje ověřit citlivost metody dPCR a stanovit limit detekce. Dále koncentrační řada umožňuje identifikovat lineární rozsah metody, ve kterém počet detekovaných kopií cílové DNA roste nebo klesá v přímém poměru k počtu skutečných kopií vstupní DNA. To je klíčové pro správné kvantifikace cílové DNA v neznámých vzorcích. Slouží také k ověření přesnosti metody dPCR. Při analýze je klíčové sledovat signál pozitivní kontroly a rozptýl mezi replikáty. Koncentrace pozitivní kontroly by měla umožnit lineární odezvu v lineárním rozsahu metody.

Experiment byl proveden s pozitivními kontrolami pro konkrétní mutaci v exonu 12 genu *JAK2*. Byla použita koncentrační řada v rozsahu 50/25/12,5/6,25/3,125/1,5/0,7 % VAF. Ředění probíhalo v poměru 1:1 WT a pozitivní kontrola. Pro kontrolu kontaminace byla využita NTC.

Výsledkem experimentu jsou 2D grafy (Obr. č. 11), kde jsou populace umístěny ortogonálně. 2D bodové grafy znázorňují shluky bodů, které představují jednotlivé populace a kompartmenty v nich. Každý bod v grafu znázorňuje jednu kapku/krytal, která je umístěna podle intenzity fluorescenčního signálu. Z výsledků je patrné, že i při koncentraci mutantní alely 0,7 % se objevují pozitivní signály v oblasti s danou fluorescencí.



Obr.č. 11: Na 2D grafu A, B, C, D, E jsou *scatterplots* znázorňující koncentraci sondy *JAK2* (50/25/12,5/6,25/3,125/1,5/0,7 nM)

5. Diskuze

Detekce mutací v genu *JAK2* je zásadní pro diagnostiku pacientů s Ph-negativním myeloproliferativním onemocněním. Mutace v tomto genu, konkrétně záměna V617F v exonu 14 je častá u těchto hematologických onemocnění. Tato genetická změna je klíčová pro jejich diferenciální diagnostiku (Baxter *et al.*, 2005).

Detekce mutací v genu *MPL* je klíčová pro diagnostiku pacientů s primární myelofibrózou a esenciální trombocytémií. Gen *MPL* kóduje receptor trombopoetinu (TPO), který je regulátorem produkce krevních destiček. Mutace v genu *MPL* mohou vést k patologické aktivaci signální dráhy JAK-STAT, která může mít za následek zvýšenou produkci krevních destiček a dalších hematopoetických buněk (Boyd *et al.*, 2010).

Existuje několik metod pro detekci mutací v genu *JAK2* a *MPL*. Mezi ně patří fragmentační analýza, analýza křivky tání (HRM), Sangerovo sekvenování, pyrosekvenování, alelově specifická PCR, kvantitativní PCR a další. Tyto metody mají své výhody, ale i omezení v oblasti citlivosti, specifčnosti, nákladů a doby odezvy analýzy. Fragmentační analýza je založena na detekci délky fragmentů amplifikované DNA, zatímco HRM využívá změny teploty tání PCR produktu pro rozlišení mutovaných a *wild type* alel. Sangerovo sekvenování je tradiční metodou sekvenování. Pyrosekvenování je formou masivně paralelního sekvenování umožňující paralelní sekvenování velkého počtu fragmentů DNA současně. Kvantitativní PCR umožňuje kvantifikaci cílů v reálném čase pomocí fluorescenčních signálů. Je citlivější než klasická PCR, ale stále má určitá omezení v detekci mutací s nízkým procentuálním zastoupením ve vzorku (Jones *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2007).

V roce 2007 Frantz *et al.* detekovali mutace *JAK2* u 36 pacientů s myeloproliferativními onemocněními pomocí různých metod, včetně analýzy polymorfismů délky restrikčních fragmentů (RFLP) a alelově-specifické PCR (AS-PCR). Výsledky obou metod naznačují nedostatky v oblasti nízké citlivosti detekce pro vzorky s nízkým zastoupením mutantní alely. Tyto byly metodou RFLP zcela neanalyzovatelné (LOD = 5%). Nižší citlivost vedla k falešně negativním výsledkům, tudíž k chybné interpretaci výsledků a poddiagnostikování pacientů. Tato metoda je navíc časově velmi náročná.

Carillo *et al.* v roce 2011 se ve své studii zaměřovali na problematiku detekce mutací v exonu 12 genu *JAK2*. Studie zdůrazňuje potřebu přesných a citlivých detekčních metod z důvodu nízké alelické zátěže mutacemi. Srovnává výhody a omezení různých metod, jako je alelově specifická PCR, sekvenování a HRM analýza. HRM analýza je prezentována jako spolehlivý screeningový postup pro detekci mutací v exonu 12 genu *JAK2*. Výsledky ukázaly úspěšnou identifikaci mutací u 15/45 (33 %) pacientů s polycythemia vera (PV). Metoda dosáhla technické citlivosti 100 % a specificity 96,7 % s prahovými hodnotami detekce v rozmezí 1-3 % alelické zátěže v závislosti na mutaci. Autor zmiňuje vyšší citlivost HRM analýzy proti běžným metodám jako je Sangerovo sekvenování nebo AS-CR a výhodu snadné aplikace a nezávislosti na metodách izolace DNA.

V roce 2013 studie Furtado *et al.* využili variantu fragmentační analýzy (multiplex fluorescenční AS-PCR) pro detekci mutací v exonu 12 genu *JAK2*. Byla vyvinuta jako citlivější alternativa k již existujícím metodám jako je Sangerovo sekvenování a HRM analýza. Sekvenování nedokáže detekovat mutace s VAF <15-20 %. Metoda fragmentační analýzy byla ověřena na klinických vzorcích 20 pacientů s PV a dalšími myeloproliferativními onemocněními. Výsledky ukázaly, že tato metoda je schopna detekovat mutace v exonu 12 genu *JAK2* s citlivostí až 2 % VAF. V porovnání se Sangerovým sekvenováním a HRM analýzou prokázal test fragmentační analýzy větší citlivost a spolehlivost. Dokázali úspěšně identifikovat i ty případy, které jinými metodami nebyly zachyceny.

Detekce mutací v genu *MPL* je důležitým diagnostickým nástrojem pro pacienty s podezřením na primární myelofibrózu (PMF) a esenciální trombocytémií (ET). Nová multiplexní alelově specifická PCR metoda, kterou popsala Furtado *et al.* v roce 2013, umožňuje snadnou identifikaci mutací W515L, W515K, W515A a S505N. Metoda zachytila 45 pacientů s mutací W515L, 6 s mutací S505N, 5 s mutací W515K, 1 s mutací W515A a 1 s kombinací mutací W515L a S505N ze souboru 1380 pacientů s diagnostikovanou MPN. Z tohoto souboru sedm pacientů mělo mutaci *MPL* pod hranicí 5 % VAF a konfirmační metoda Sangerova sekvenování je nedetekovala. Dalších 10 pacientů mělo hladinu mutací mezi 5 % - 15 % VAF, u nichž detekce pomocí Sangerova sekvenování rovněž nabyla spolehlivá. Výsledky naznačují, že alelově specifická PCR je spolehlivým a citlivým řešením pro diagnostiku myeloproliferativních neoplázií, které nemohou být detekovány běžnými metodami jako Sangerovo sekvenování.

Alghasham *et al.* v roce 2016 pomocí Sangerova sekvenování sledovali mutace v exonech 12-15 genu *JAK2*. Tato studie provedla analýzu mutací *JAK2* u 1811 pacientů s diagnostikovanou MPN. Z těchto pacientů byla u 271 (16 %) prokázána mutace *JAK2*. Nejfrekventovanější mutací byla záměna p.V617F, která byla nalezena u 262/271 (96,7 %) pacientů. U 9 /271 (3,3 %) pacientů byla nalezena mutace v exonu 12 genu *JAK2*. Tato studie potvrzuje význam mutací *JAK2* jako diagnostických markerů pro MPN.

Studie Ullah *et al.* v roce 2022 referuje metodu qPCR pro detekci mutací v genu *MPL* na úrovni LOD 5 % VAF. Tato metoda ukázala výhody jako kratší doba odezvy a nižší náklady. Celkem bylo otestováno 128 pacientů s diagnostikovanou MPN. Mutace *MPL* byly úspěšně detekovány u 3/128 (2,34 %) pacientů. Výsledky naznačují, že tato metoda je vhodná pro screening mutací *MPL*.

V roce 2022 Araiho *et al.* provedli analýzu genů spojených s MPN pomocí genového analyzátoru i-densy IS-5320 (fully autommated gene analyzer). Analyzovali 384 vzorků. U nich zachytili 171 mutací *JAK2* V617F, 10 mutací v exonu 12 *JAK2*, 104 mutací v *CALR* a 26 mutací v *MPL*. Mutace byly detekovány alelově specifickou PCR, digitální PCR a přímou sekvenací. Závěry studie naznačují, že i-densy IS-5320 je účinnou metodou pro detekci genových mutací spojených s MPN. Celkově měla tato metoda vysokou citlivost a specificitu při detekci mutací v genech *JAK2* V617F, *JAK2* exon12, *CALR* a *MPL*. Nicméně metoda má svá omezení, zejména pokud jde o detekci vzácných mutací s nízkou alelickou náloží.

V této práci byla optimalizována metoda dPCR od firmy Stilla pro detekci mutací F537_K539L, N542_E543del, E543_D544del, H538_K539QL v genu *JAK2* a mutace W515K, W515L, S505N v genu *MPL* u souboru pacientů léčených s diagnózou Ph-negativní myeloproliferativní neoplázií. Digitální PCR od firmy Stilla umožňuje multiplexování až s šesti různými fluorochromy. Experimenty pro optimalizaci zahrnovaly homozygotní kontroly (Gene block Fragment, IDT) nasyntetizované pro konkrétní variantu/mutaci a sondy se specifickým fluoroforem. V souboru 22 pacientů s erytrocytózou NS jsme ověřovali přítomnost nejčastěji zastoupených mutací v exonu 12 genu *JAK2*. Reakce byla provedena jako multiplexní. V daném souboru pacientů byly mutace ověřeny a prokázány pouze u vzorků, u nichž byla mutace prokázána předešlou fragmentační analýzou. U žádného dalšího vzorku nebyla mutace v exonu 12 genu *JAK2* zachycena. Detekce mutací v této oblasti je komplikovaná jejich nízkou náloží. Tyto mutace se vyskytují

velmi vzácně. U 5 pacientů s předem prokázanou mutací v genu *MPL* byla nastavena a optimalizována multiplexní detekce pro simultánní analýzu v kodonech W515 a S505. U všech pacientů byly mutace detekovány. Podařilo se nám nastavit experimenty tak, aby byly využitelné v rutinní diagnostice.

6. Závěr

Použití metody digitální PCR (dPCR) od firmy Stilla je vhodné pro detekci mutací v genech *JAK2* a *MPL* u pacientů s Ph-negativními myeloproliferativními onemocněními (MPN). Tato technologie umožňuje multiplexování s použitím až šesti různých detekčních fluorescenčních kanálů, které poskytují flexibilitu a efektivitu při analýze vzorků.

V rámci experimentů byla zoptimalizována multiplexní assay pro detekci mutací v exonu 12 genu *JAK2* a genu *MPL*. Kompenzace a optimalizace dPCR jsou nezbytné pro správnou interpretaci výsledků a minimalizaci nespecifických efektů, jako je přelévání fluorescence (přesvit) a vznik "rainu". Vytvořili jsme kompenzační matici a optimalizovali jsme teplotu dPCR, což vedlo ke zlepšení rozlišení pozitivních a negativních populací a snížení falešně pozitivních výsledků. V další fázi optimalizace jsme se zabývali stanovením optimální koncentrace sondy a pozitivních kontrol pro dosažení nejlepšího poměru mezi citlivostí a specificitou detekce cílových sekvencí.

Provedli jsme ověření účinnosti obou assayí na pacientech, u kterých byla dříve mutace detekována alternativní metodou. Poté bylo vyšetřeno 22 pacientů s erytrocytózou NS, u nichž nebyla mutace zachycena ani metodou dPCR. Nicméně tyto assaye jsou nyní připraveny k rutinnímu použití pro diagnostické vyšetření.

Digitální PCR se ukázala jako efektivní nástroj pro citlivou a spolehlivou detekci mutací s vysokou specificitou, což je klíčové pro diagnostiku a monitorování pacientů s MPN. Díky svým výhodám ve srovnání s tradičními metodami by mohla být digitální PCR perspektivním směrem pro budoucí výzkum a klinickou praxi v oblasti hematologie a onkologie.

Seznam publikací

Alexander, W. S., Roberts, A. W., Maurer, A. B., Nicola, N. A., Dunn, A. R., & Metcalf, D. (1996). Studies of the c-Mpl Thrombopoietin Receptor through Gene Disruption and Activation. *Stem Cells*, **14**(1), 124–132.

Alghasham, N., Alnouri, Y., Abalkhail, H., & Khalil, S. (2016). Detection of mutations in JAK2 exons 12–15 by Sanger sequencing. *International Journal of Laboratory Hematology*, **38**(1), 34-41.

Baxter, E. J., Scott, L. M., Campbell, P. J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G. S., Bench, A. J., Boyd, E. M., Curtin, N., Scott, M. A., Erber, W. N., & Green, A. R.; Cancer Genome Project. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, **365**(9474), 1054–1061.

Bogožalec Košir, A., Demšar, T., Štebih, D., Žel, J., & Milavec, M. (2019). Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices. *Food Chemistry*, **294**, 73-78.

Boyd, E. M., Bench, A. J., Goday-Fernández, A., Anand, S., Vaghela, K. J., Beer, P., Scott, M. A., Bareford, D., Green, A. R., Huntly, B., & Erber, W. N. (2010). Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *British Journal of Haematology*, **149**(2), 250-257.

Bräuninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renné, C., Hansmann, M.-L., & Küppers, R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Cancer*, **118**, 1853-1861.

Carillo, S., Henry, L., Lippert, E., Girodon, F., Guiraud, I., Richard, C., & Lavabre-Bertrand, T. (2011). Nested High-Resolution Melting Curve Analysis: A Highly Sensitive, Reliable, and Simple Method for Detection of Jak2 Exon 12 Mutations—Clinical Relevance in the Monitoring of Polycythemia. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **13**(3), 263-270.

Coccaro, N., Tota, G., Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G., & Albano, F. (2020). Digital PCR: A Reliable Tool for Analyzing and Monitoring Hematologic Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(9), 3141.

Day, E., Dear, P. H., & McCaughan, F. (2013). Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*, **59**(1), 101-107.

Dean, L. (2005). Blood Groups and Red Cell Antigens, *National Center for Biotechnology Information*, **1**(1), 1-2.

Feng, X. J., Yi, H. M., & Ren, X. X. (2020). Digital PCR and its application in biological detection. *Hereditas*, **42**(4), 363-373.

- Furtado, L. V., Weigelin, H. C., Elenitoba-Johnson, K. S. J., & Betz, B. L. (2013). A Multiplexed Fragment Analysis-Based Assay for Detection of JAK2 Exon 12 Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **15**(5), 592-599.
- Furtado, L. V., Weigelin, H. C., Elenitoba-Johnson, K. S. J., & Betz, B. L. (2013). Detection of MPL Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **15**(6), 810-818.
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, **133**(3), 1-4
- Guglielmelli, P., & Calabresi, L. (2021). Chapter Five - The MPL mutation. In N. Bartalucci & L. Galluzzi (Eds.), *International Review of Cell and Molecular Biology* **365**, 163-178.
- He, X., Chen, Z., Jiang, Y., Qiu, X., & Zhao, X. (2013). Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct haematopoietic diseases. *Journal of Hematology & Oncology*, **6**, 11.
- Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., Vessella, R. L., & Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*, **10**(10), 1003-1005.
- Hou, Y., Chen, S., Zheng, Y., Zheng, X., & Lin, J.-M. (2023). Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications. *Trends in Analytical Chemistry*, **158**, 116897.
- Hudecova, I. (2015). Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clinical Biochemistry*, **48**(15), 948-956.
- Huggett, J. F., & Whale, A. (2013). Digital PCR as a Novel Technology and Its Potential Implications for Molecular Diagnostics. *Clinical Chemistry*, **59**(12), 1691-1693.
- Chen, Q., Lu, P., Jones, A. V., Cross, N. C., Silver, R. T., & Wang, Y. L. (2007). Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Journal of Molecular Diagnostics*, **9**(2), 272-276.
- Jagannathan-Bogdan, M., & Zon, L. I. (2013). *Hematopoiesis. Development*, **140**(12), 2463-2467.
- James, C., Ugo, V., & Le Couédic, J.P. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, **434**, 1144-1148.
- Kuypers, J. (2017). Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, **55**.

- Lee, J. Y., & Hong, S. H. (2020). Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *International Journal of Stem Cells*, **13**(1), 1-12.
- Mao, X., Liu, C., Tong, H., Chen, Y., & Liu, K. (2019). Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American Journal of Translational Research*, **11**(12), 7209-7222.
- Mignotte, V., Vigon, I., Boucher de Crèvecoeur, E., Roméo, P. H., Lemarchandel, V., & Chrétien, S. (1994). Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL). *Genomics*, **20**(1), 5-12.
- Michiels, J. J., Tevet, M., Trifa, A., Niculescu-Mizil, E., Lupu, A., Vladareanu, A. M., Bumbea, H., Ilea, A., Dobrea, C., Georgescu, D., Patrinoiu, O., Popescu, M., Murat, M., Dragan, C., Mihai, F., Zurac, S., Angelescu, S., Iova, A., Popa, A., Gogulescu, R., & Popov, V. (2016). WHO Clinical Molecular and Pathological Criteria for Classification and Staging of Myeloproliferative Neoplasms (MPN) Caused by MPN Driver Mutations in the JAK2, MPL and CALR Genes in the Context of New 2016 WHO Classification: Prognostic and Therapeutic Implications. *Maedica*, **11**(1), 5-25.
- Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomolecular Detection and Quantification*, **1**(1), 1-2.
- Netzer, R., Ribičić, D., Aas, M., Cavé, L., & Dhawan, T. (2021). Absolute quantification of priority bacteria in aquaculture using digital PCR. *Journal of Microbiological Methods*, **183**, 106171.
- Orkin, S.H. (1995). Hematopoiesis: How does it happen? *Current Opinion in Cell Biology*, **7**(6), 870-877.
- Park, S., Zhang, Y., Lin, S., Wang, T.-H., & Yang, S. (2011). Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnology Advances*, **29**(6), 830-839.
- Passamonti, F., Maffioli, M., Caramazza, D., & Cazzola, M. (2011). Myeloproliferative neoplasms: from JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. *Oncotarget*, **2**(6), 485-490.
- Purcell, R. V., Pearson, J., Frizelle, F. A., & Keenan, J. I. (2016). Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Scientific Reports*, **6**, 34554.
- Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, **18**(4), 1271.
- Raedler, L. A. (2014). Diagnosis and Management of Polycythemia Vera: Proceedings from a Multidisciplinary Roundtable. *American Health & Drug Benefits*, **7**(3), S36-S47.

- Raess, P., van de Geijn, G.-J., Njo, T., Klop, B., Sukhachev, D., Wertheim, G., & Bagg, A. (2014). Automated screening for myelodysplastic syndromes through analysis of complete blood count and cell population data parameters. *American Journal of Hematology*, **89**(4), 369–374.
- Rieger, M. A., & Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**(12).
- Robin, J., Ludlow, A., & LaRanger, R. (2016). Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing. *Scientific Reports*, **6**, 2467.
- Schafer, A.I. (2006). Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*, **107**(11), 4214-4222.
- Schlesinger, M. (2018). Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *Journal of Hematology & Oncology*, **11**(1), 125.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **72**(1), 7-33.
- Stahl, T., Böhme, M. U., Kröger, N., & Fehse, B. (2015). Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, **43**(6), 462.
- Strain, M. C., Lada, S. M., Luong, T., Rought, S. E., Gianella, S., Terry, V. H., & Richman, D. D. (2013). Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *Public Library of Science*, **8**(4), 5943.
- Tadmor, A. D. (2011). Probing Individual Environmental Bacteria for Viruses by Using Microfluidic Digital PCR. *Science*, **333**, 58-62.
- Tan, L. L., Loganathan, N., Agarwalla, S., Yang, C., Yuan, W., Zeng, J., Wu, R., Wang, W., & Duraiswamy, S. (2023). Current commercial dPCR platforms: technology and market review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **43**(3), 433-464.
- Tan, L. L., Loganathan, N., Agarwalla, S., Yang, C., Yuan, W., Zeng, J., Wu, R., Wang, W., & Duraiswamy, S. (2023). Current commercial dPCR platforms: technology and market review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **43**(3), 433-464.
- Tefferi, A. (2008). JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, **49**(3), 388-397.
- Tefferi, A., & Pardanani, A. (2014). CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **11**, 125–126.

Them, N. C., & Kralovics, R. (2013). Genetic basis of MPN: Beyond JAK2-V617F. *Current Hematology Malignancy Reports*, **8**(4), 299-306.

Tremblay, D., Yacoub, A., & Hoffman, R. (2021). Overview of Myeloproliferative Neoplasms: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications. *Hematology Oncology Clinics of North America*, **35**(2), 159-176.

Treon, S. P., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Sheehy, P., Manning, R. J., Patterson, C. J., Tripsas, C., Arcaini, L., Pinkus, G. S., Rodig, S. J., Sohani, A. R., Harris, N. L., Laramie, J. M., Skifter, D. A., Lincoln, S. E., & Hunter, Z. R. (2012). MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine*, **367**(9), 826-833.

Ullah, N., Khan, S. N., Umair, M., Khan, A. A., Liu, X., Khattak, A. A., & Yousafzai, Y. M. (2022). Development of a Real-Time qPCR Assay for Detection of Common MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms (MPNS). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **194**(12), 5907-5917.

Van Etten, R. A., Koschmieder, S., Delhommeau, F., Perrotti, D., Holyoake, T., Pardanani, A., & Goldman, J. (2011). The Ph-positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical and clinical issues. *Haematologica*, **96**(4), 590-601.

Váňová, B., Malicherova, B., Burjanivová, T., Liskova, A., Janikova, K., Jasek, K., Lasabová, Z., Tatár, M., & Plank, L. (2021). Droplet digital PCR as a novel diagnostic tool. *Klinická Onkologie*, **34**(1), 33-39.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(16), 9236-9241.

Ziegler, A. G., Rewers, M., Simell, O., Simell, T., Lempainen, J., Steck, A., Winkler, C., Ilonen, J., Veijola, R., Knip, M., Bonifacio, E., & Eisenbarth, G. S. (2013). Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Journal of the American Medical Association*, **309**(23).

Manuály

Bio-Rad. (2013) Droplet Generator Instruction Manual [online].

Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10031907.pdf>

Qiagen. (2021) QIAcuity User Manual [online].

Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=ad681197-cdf1-401c-89c7-2db518129e86&lang=en>

Stilla Technologies. (2022) Stilla Naica system brochure [online].

Dostupné z: <https://www.stillatechnologies.com/wp-content/uploads/2022/08/stilla-naica-system-brochure.pdf>

Seznam použitých symbolů a zkratek

Allo-HSCT	Alogenní transplantace hematopoetických buněk
AML	Akutní myeloidní leukémie
BCR-ABL1	Fúzní gen BCR-ABL1
CALR	Kalretikulin
CAMT	Amegakaryocytární trombocytopenie
CBCL	Kožní difúzní velkobuněčný B-lymfom
CD	Cluster of differentiation
cffDNA	Cirkulující volná fetální DNA
CLP	Lymfoidní progenitor
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMP	Myeloidní progenitor
CNV	Variace počtu kopií
CNV	Počet kopií vektoru
Cp	Crossing point
ctDNA	Cirkulující tumorová DNA
CY5	Cyanin 5
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dPCR	Digitální polymerázová řetězová reakce
ET	Esenciální trombocytémie
FAM	Fluorescein Amidit
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GMO	Geneticky modifikované organismy

HEX	Hexachlorfluorescein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPV	Human Papillomavirus
HSC	Hematopoetické kmenové buňky
HTH	ereditární trombocytémie
JAK	Janusova kináza
JH	Janus homology domain
MNS	Myeloidní neoplázie sleziny
MPD	Myeloproliferativní onemocnění
MPL	Trombopoetinový receptor
MPN	Myeloproliferativní neoplázie
MYD88	MYD88 innate immune signal transduction adaptor
NGS	Next Generation Sequencing
NTC	Netemplátová kontrola
PCNSL	Primární lymfom centrálního nervového systému
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR	Polymerázová řetězová reakce
Ph	Philadelphský chromozom
PMF	Primární myelofibróza
PV	Polycythemia vera
RNA	Ribonukleová kyselina
RT-qPCR	Kvantitativní PCR v reálném čase
SH	Src homology domain
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription

TaqMan	Metoda detekce v reálném čase
WM	Waldenströmova makroglobulinémie
WT	Wild type (divoký typ)
XPO1	Exportin