

2017 • 2018
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Gebruik van gBlocks als positieve ddPCR-controle voor de detectie van therapieresistente mutaties in BCR-ABL1-positieve leukemie

PROMOTOR :

dr. ir. Kristel SNIEGOWSKI

PROMOTOR :

dr. apr. Els LIERMAN

Steffi Melon

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



2017 • 2018

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Gebruik van gBlocks als positieve ddPCR-controle voor de detectie van therapieresistente mutaties in BCR-ABL1-positieve leukemie

PROMOTOR :

dr. ir. Kristel SNIÉGOWSKI

PROMOTOR :

dr. apr. Els LIERMAN

Steffi Melon

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie



KU LEUVEN

Woord vooraf

Gedurende drie maanden heb ik mijn stage mogen doen aan Centrum Menselijke Erfelijkheid (CME) in UZ Gasthuisberg Leuven. Meteen maakte ik kennis met de wereld van moleculaire diagnostiek met betrekking tot de verworven hematologische en oncologische aandoeningen. Zowel op theoretisch vlak als op praktisch vlak heb ik gedurende deze periode veel kunnen bijleren en vooral veel ervaring kunnen opdoen met de hulp en de steun van veel mensen op de afdeling van MD2.

In de eerste plaats wil ik vooral een dankwoord richten aan mijn externe promotor dr. apr. Els Lierman voor de kans die ze mij gegeven heeft om deze zeer leerrijke en interessante stage te mogen beleven. Ook voor de goede begeleiding die ik gedurende deze periode heb mogen ervaren. Ik werd begeleid in zowel de theoretische achtergrond van het onderwerp, de praktische uitvoering als in het schrijven van deze scriptie. Als ergens problemen of vragen opdoken dan kon ik altijd bij haar terecht. In de tweede plaats wil ik ook een dankwoord richten aan alle laboranten van de afdeling MD2 voor alle praktische hulp. Zij hebben een grote bijdrage geleverd aan deze aangename stageperiode.

Daarnaast wil ik mijn interne promotor dr. ir. Kristel Sniegowski bedanken voor haar feedback en hulp bij het schrijven van deze scriptie. Ook een dankwoord aan docent communicatie dr. Jeroen Lievens voor zijn feedback omtrent het communicatie-aspect rond deze masterthesis.

Als laatst wil ik ook nog een speciaal dankwoord richten aan mijn ouders. Ik wil hen bedanken voor het geduld dat ze voor mij hebben uitgeoefend en voor de kans die ze mij gegeven hebben om dit tot een goed einde te kunnen brengen.

INHOUDSOPGAVE

<i>Woord vooraf</i>	1
<i>Lijst met tabellen</i>	7
<i>Lijst met figuren</i>	9
<i>Woordenlijst</i>	11
<i>Abstract</i>	15
<i>Abstract in English</i>	17
1 INLEIDING	19
1.1 SITUERING	19
1.2 PROBLEEMSTELLING	20
1.3 DOELSTELLINGEN	21
1.4 MATERIAAL EN METHODE	22
2 LITERATUURSTUDIE	23
2.1 HEMATOPOIESE	23
2.2 LEUKEMIE	24
2.3 PHILADELPHIA CHROMOSOOM POSITIEVE LEUKEMIE	24
2.3.1 <i>Reciproke translocatie tussen chromosoom 9 en 22</i>	24
2.3.1.1 <i>Abelson proteïne kinase 1</i>	24
2.3.1.2 <i>Breakpoint cluster region</i>	26
2.3.1.3 <i>BCR-ABL1-fusiegen</i>	26
2.3.2 <i>Philadelphia chromosoom positieve leukemie</i>	27
2.3.2.1 <i>BCR-ABL1-positieve chronische myeloïde leukemie</i>	27
2.3.2.2 <i>BCR-ABL1-positieve B-cel acute lymfatische leukemie</i>	28
2.3.3 <i>Opsporen Philadelphia chromosoom</i>	28
2.3.3.1 <i>Cytogenetica</i>	30
2.3.3.2 <i>Moleculaire technieken</i>	31
2.3.4 <i>Behandeling Philadelphia chromosoom positieve leukemie</i>	31
2.3.4.1 <i>Eerste generatie TKI</i>	33
2.3.4.2 <i>Tweede generatie TKI's</i>	35
2.3.4.3 <i>Derde generatie TKI's</i>	36
2.3.4.4 <i>Richtlijnen voor gebruik van tyrosinekinase-inhibitoren</i>	37
2.3.5 <i>Mutatieanalyse van het ABL1-kinasedomein</i>	38
3 MATERIAAL EN METHODE	41
3.1 MATERIAAL	41
3.1.1 <i>Eerstelijnscontrole</i>	41
3.1.1.1 <i>Negatieve controle</i>	41
3.1.1.2 <i>Positieve controle</i>	41
3.1.2 <i>ddPCR</i>	42

3.2 METHODE	44
3.2.1 <i>ddPCR-mutatieanalyse</i>	44
3.2.1.1 Principe	44
3.2.1.2 Werkwijze	46
3.2.1.3 Interpretatie van de data.....	47
3.2.2 <i>Optimalisatie p.V299L-assay</i>	50
3.2.3 <i>Verificatie overige ABL1-assays</i>	52
3.2.4 <i>Validatie p.V299L-assay</i>	52
3.2.4.1 Juistheid	53
3.2.4.2 Reproduceerbaarheid	53
3.2.4.3 Robuustheid	54
3.2.4.4 Detectielimiet.....	54
3.2.5 <i>Verdunning van de gBlocks</i>	55
3.2.6 <i>Aanmaak ddPCR-multiplexen</i>	57
3.2.6.1 Werkwijze	57
3.2.6.2 Protocol.....	58
4 RESULTATEN	61
4.1 P.V299L-MUTATIEANALYSE MET DDPCR	61
4.1.1 <i>Optimalisatie p.V299L-assay</i>	61
4.1.1.1 Aanpassen DNA-input	62
4.1.1.2 Aanpassen annealingtemperatuur	62
4.1.1.3 Temperatuurgradiënt voor p.T315I- en p.V299L-assays.....	65
4.1.1.4 Aanpassen restrictie-enzym	67
4.1.1.5 Verificatie andere ABL1-mutatieassays met gewijzigd protocol	67
4.1.1.6 Resultaat optimalisatie protocol voor p.V299L-assay	69
4.1.2 <i>Validatie p.V299L-assay</i>	69
4.1.2.1 Juistheid	69
4.1.2.2 Reproduceerbaarheid	71
4.1.2.3 Robuustheid	71
4.1.2.4 Detectielimietcontrole.....	72
4.1.2.5 Algemeen besluit validatie.....	72
4.2 SINGLEPLEX GBLOCKS ALS POSITIEVE CONTROLE	73
4.2.1 <i>Validatie p.F359V-gBlock</i>	73
4.2.1.1 Resultaten.....	73
4.2.1.2 Algemeen besluit p.F359V-gBlock	74
4.2.2 <i>Validatie p.V299L-gBlock</i>	75
4.2.2.1 Resultaten.....	75
4.2.2.2 Vergelijking p.V299L-gBlock met patiënten-DNA	77
4.2.2.3 Algemeen besluit p.V299L-gBlock	78
4.2.3 <i>Validatie overige ABL1-gBlocks</i>	79
4.2.3.1 Resultaten.....	79
4.2.3.2 Algemeen besluit overige ABL1-gBlocks	81

4.3 MULTIPLEXEN	83
4.3.1 <i>Multiplexen primer/probe-assay in reactiemix</i>	83
4.3.1.1 Multiplex-reactiemix A.....	83
4.3.1.2 Multiplex-reactiemix B.....	85
4.3.1.3 Multiplex-reactiemix C.....	86
4.3.1.4 Algemeen besluit multiplexen primer/probe-assay	87
4.3.2 <i>Multiplexen gBlocks</i>	87
4.3.2.1 gBlock-mix A.....	88
4.3.2.2 gBlock-mix B.....	89
4.3.2.3 gBlock-mix C.....	89
4.3.2.4 Algemeen besluit multiplexen gBlocks	90
4.3.3 <i>Reductie hoeveelheid primer/probe-assay in reactiemix</i>	90
4.3.4 <i>Algemeen besluit multiplex.....</i>	92
5 BESLUIT.....	93
LITERATUURLIJST	95
BIJLAGENLIJST	99

Lijst met tabellen

<i>Tabel 1: ELN-richtlijnen: beoordeling van de respons op TKI-therapie.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabel 2: Voorstelling structuurformules voor tyrosinekinase-inhibitoren</i>	<i>32</i>
<i>Tabel 3: Overzicht verschillende behandelingen met 5 verschillende TKI's.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabel 4: Gevoeligheid van TKI's voor mutaties in het ABL1-kinasedomein.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabel 5: Hoeveelheden reagentia voor ddPCR-analyse</i>	<i>42</i>
<i>Tabel 6: Gebruikt ddPCR-programma</i>	<i>47</i>
<i>Tabel 7: Reeds gevalideerde thresholds van ABL1-assays bij 55°C</i>	<i>52</i>
<i>Tabel 8: Eigenschappen verschillende ABL1-assays en samenstelling multiplexen</i>	<i>57</i>
<i>Tabel 9: Samenstelling multiplex-reactiemix</i>	<i>58</i>
<i>Tabel 10: Bereiding gBlock-mixen vertrekkende van singleplex gBlocks</i>	<i>59</i>
<i>Tabel 11: Aanmaak multiplex-reactiemixen aan 1/2-volume primer/probe-assay.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabel 12: ddPCR-programma bij temperatuurgradiënt: 50°C – 60°C</i>	<i>63</i>
<i>Tabel 13: ddPCR-programma bij temperatuurgradiënt: 49.0°C - 53.7°C.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabel 14: Temperatuurgradiënt voor p.V299L- p.T315I-assay.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabel 15: Resultaten thresholds bij 52.5 °C en vergelijking FA bij 55°C en 52.5°C</i>	<i>68</i>
<i>Tabel 16: False positive rate voor p.V299L-assay bij 55°C.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabel 17: Resultaten intra-runvariatie p.V299L-assay.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabel 18: Resultaten inter-runvariatie p.V299L-assay.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabel 19: Resultaten detectielimietcontrole: FA p.V299L-gBlock bij verschillende runs.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabel 20: Bereiding p.F359V-gBlock: 5 en 10 mutante kopijen/μL.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabel 21: Bereiding p.V299L-gBlock 5 mutante kopijen/μL</i>	<i>75</i>
<i>Tabel 22: Bereiding p.V299L-gBlock met FA 0.5%.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabel 23: Bereiding overige vijf condities: bepaling aantal kopijen/μL in tussenverduunning</i>	<i>79</i>
<i>Tabel 24: Resultaten overige vijf gBlock-condities met berekende verdunningsfactor</i>	<i>80</i>
<i>Tabel 25: Bereiding overige vijf condities met een FA ~ 0.5%.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabel 26: Resultaten overige vijf gBlock-condities.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabel 27: Vergelijking FA voor singleplex en multiplex-reactiemix A.....</i>	<i>84</i>
<i>Tabel 28: Vergelijking aantal single-FAM-druppels in singleplex en multiplex-reactiemix A</i>	<i>84</i>
<i>Tabel 29: Vergelijking FA voor singleplex en multiplex-reactiemix B.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabel 30: Vergelijking aantal single-FAM-druppels in singleplex en multiplex-reactiemix B</i>	<i>86</i>
<i>Tabel 31: Vergelijking FA voor singleplex en multiplex-reactiemix C.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabel 32: Vergelijking aantal single-FAM-druppels in singleplex en multiplex-reactiemix C</i>	<i>87</i>
<i>Tabel 33: Vergelijking FA voor gBlock-mix en singleplex gBlocks in mutliplex-reactiemix ..</i>	<i>90</i>

Lijst met figuren

<i>Figuur 1: Voorstelling hematopoiese</i>	23
<i>Figuur 2: Domeinen van ABL1-eiwit</i>	25
<i>Figuur 3: Werking inactief en actief c-ABL-eiwit</i>	25
<i>Figuur 4: Domeinen BCR-eiwit</i>	26
<i>Figuur 5: Vorming twee hybridegenen door translocatie t(9;22)</i>	26
<i>Figuur 6: Vorming BCR-ABL-tetrameer</i>	27
<i>Figuur 7: Overproductie van immature B-lymfocyten leidt tot B-cel ALL</i>	28
<i>Figuur 8: Vorming van verschillende fusietranscripten</i>	29
<i>Figuur 9: Karyotypering voor opsporen van translocatie t(9;22)</i>	30
<i>Figuur 10: Detectie Philadelphia chromosoom met dual-color-FISH</i>	30
<i>Figuur 11: Werking inhibitie door imatinib</i>	33
<i>Figuur 12: Resistentiemechanisme tegen imatinib</i>	34
<i>Figuur 13: Principe nRT-PCR</i>	39
<i>Figuur 14: Principe ddPCR</i>	39
<i>Figuur 15: Principe DNA-extractie met magnetische beads</i>	41
<i>Figuur 16: Gebruikte materialen voor ddPCR-mutatieanalyse</i>	43
<i>Figuur 17: Endonuclease MseI</i>	44
<i>Figuur 18: Generatie van druppels met Droplet Generator voor de ddPCR-reactie</i>	44
<i>Figuur 19: Annealing van twee fluorofore probes</i>	45
<i>Figuur 20: Voorstelling 2D-plot verkregen door QuantaSoft-software</i>	45
<i>Figuur 21: A) Droplet Cartridge B) Droplet Generator</i>	46
<i>Figuur 22: Samenvatting ddPCR-methode</i>	47
<i>Figuur 23: Voorbeeld van het totale aantal gegenereerde druppels > 10000</i>	47
<i>Figuur 24: No-template-controle</i>	48
<i>Figuur 25: DLD-1-controle</i>	48
<i>Figuur 26: Positieve controle</i>	49
<i>Figuur 27: Concentratiegrafiek uitgedrukt in aantal kopijen /μL</i>	49
<i>Figuur 28: Fractional abundance</i>	50
<i>Figuur 29: Knipplaatsen restrictie-enzymen HaeIII en MseI</i>	51
<i>Figuur 30: Optimalisatie clusterscheiding door gebruik van een temperatuurgradiënt</i>	51
<i>Figuur 31: Voorstelling seriële verdunningsreeks voor p.F359V-gBlock</i>	55
<i>Figuur 32: Aanpassing seriële verdunningsreeks om verdunningsfouten te beperken</i>	56
<i>Figuur 33: Positie puntmutaties in ABL1-kinasedomein</i>	58
<i>Figuur 34: Huidig protocol voor de p.V299L-mutatieanalyse met ddPCR</i>	61
<i>Figuur 35: SR-staal met verschillende concentraties aan DNA-input</i>	62
<i>Figuur 36: Resultaten optimalisatie met annealingtemperatuur (1) 50°C-60°C</i>	63
<i>Figuur 37: Resultaten optimalisatie met annealingtemperatuur (2) 50°C-60°C</i>	64
<i>Figuur 38: Resultaten optimalisatie met annealingtemperatuur 49.0°C-53.7°C</i>	65
<i>Figuur 39: Invloed annealingtemperatuur op p.V299L- en p.T315I-assay</i>	66
<i>Figuur 40: Resultaten optimalisatie met verschillende restrictie-enzymen MseI en HaeIII</i>	67
<i>Figuur 41: Invloed annealingtemperatuur van 52.5°C op overige vijf ABL1-mutaties</i>	68
<i>Figuur 42: Bepaling FPR</i>	70

<i>Figuur 43: Concentratiegrafiek voor p.F359V-gBlock (1)</i>	73
<i>Figuur 44: Concentratiegrafiek voor p.F359V-gBlock (2)</i>	74
<i>Figuur 45: FA voor p.F359V-gBlock</i>	74
<i>Figuur 46: Concentratiegrafiek voor p.V299L-gBlock (1)</i>	75
<i>Figuur 47: Gemiddelde FA p.V299L-gBlock (1)</i>	76
<i>Figuur 48: Gemiddelde FA p.V299L-gBlock (2)</i>	76
<i>Figuur 49: Vergelijking clusters p.V299L-gBlock bij verschillende annealingtemperaturen.</i>	77
<i>Figuur 50: Vergelijking clusters van p.V299L-gBlock met patiëntenstaal SR</i>	77
<i>Figuur 51: Vergelijking SR-patiëntenstaal voor en na Wizard-procedure</i>	78
<i>Figuur 52: Resultaat multiplex-reactiemix A</i>	83
<i>Figuur 53: Resultaat multiplex-reactiemix B</i>	85
<i>Figuur 54: Resultaat multiplex-reactiemix C</i>	86
<i>Figuur 55: Resultaat gBlock-mix A in multiplex-reactiemix A</i>	88
<i>Figuur 56: Resultaat singleplex p.V299L-gBlock in multiplex-reactiemix A</i>	88
<i>Figuur 57: Resultaat gBlock-mix B in multiplex-reactiemix B</i>	89
<i>Figuur 58: Resultaat gBlock-mix C in multiplex-reactiemix C</i>	89
<i>Figuur 59: Positie clusterwolken bij 1/2-volume primer/probe-assay</i>	91
<i>Figuur 60: Vergelijking FA voor gewoon en gereduceerd volume aan primer/probe-assay</i> ..	91

Woordenlijst

Afkorting	Verklaring
μ -bcr	Micro breakpoint cluster region in het <i>BCR</i> -gen tussen exon 19 en 20
a2	Exon 2 in het <i>ABL1</i> -gen
ABL1	Abelson proteïne kinase 1
ALL	Acute lymfatische leukemie
AML	Acute myeloïde leukemie
Annealingtemperatuur	De tweede fase binnen de PCR-reactie waarbij primers/probes gaan hybridiseren met hun complementaire basensequentie
AP	Acceleratie fase in chronische myeloïde leukemie met 10% - 19% blasten
b2/b4	Exon 13/exon15 in het <i>BCR</i> -gen
B-ALL	B-cel acute lymfatische leukemie
BCR	Breakpoint cluster region
BP	Blasten fase in chronische myeloïde leukemie
CLL	Chronische lymfatische leukemie
CML	Chronische myeloïde leukemie
CP	Chronische fase in chronische myeloïde leukemie met < 10% blasten
ddPCR	Droplet digitale polymerase chain reaction
DS96	Dropsense 96-toestel gebruikt voor het bepalen van de concentratie in ng/ μ L
ELN	European Leukemia Net

FA	Fractional abundance geeft het percentage weer van het aantal mutante kopijen/ μ L ten opzichte van het totale aantal kopijen/ μ L van zowel mutant als wildtype materiaal
FAM	Fluoresceïne amidiet wordt gebruikt als fluorofore probe (blauwe kleur) voor detectie van ABL1-mutaties
FISH	Fluorescentie-in-situhybridisatie is een cytogenetische techniek voor het opsporen van het Philadelphia chromosoom
FPR	False positive rate is een maat voor het aantal positieve FAM-druppels in een negatief staal. Deze druppels worden beschouwd als vals-positief
HEX	Hexachloor-fluoresceïne wordt gebruikt als fluorofore probe (groene kleur) voor wildtype fragmenten
LOD	Detectielimiet
M-bcr	Major breakpoint cluster region in het <i>BCR</i> -gen tussen BCR-exons 13 en 15
m-bcr	Minor breakpoint cluster region in het <i>BCR</i> -gen gelegen tussen twee alternatieve exonen
mut	Mutant
NK	Natural killer cel
nRT-PCR	Nested real time – polymerase chain reaction
Phi+	Philadelphia positief
p.E255K	Positie 255 in het BCR-ABL1 fusietranscript waarbij glutaminezuur vervangen wordt door lysine
p.F317L	Positie 317 in het BCR-ABL1 fusietranscript waarbij fenylalanine vervangen wordt door leucine
p.F359V	Positie 359 in het BCR-ABL1 fusietranscript waarbij fenylalanine vervangen wordt door valine

p.Q252H	Positie 252 in het BCR-ABL1 fusietranscript waarbij glutamine vervangen wordt door histidine
p.T315I	Positie 315 in het BCR-ABL1 fusietranscript waarbij threonine vervangen wordt door isoleucine
p.V299L	Positie 299 in het BCR-ABL1 fusietranscript waarbij valine vervangen wordt door leucine
p.Y253H	Positie 253 in het BCR-ABL1 fusietranscript waarbij tyrosine vervangen wordt door histidine
PC	Positieve controle
Ph+	Philadelphia positief
Ramp rate (°C/s)	Snelheid waarmee het PCR-toestel afkoelt of opwarmt
SH2	SRC-homologie domein 2 aanwezig in het <i>ABL1</i> -gen
ssDNA	Single stranded DNA
t(9;22)	Translocatie tussen chromosoom 9 en chromosoom 22
TKI	Tyrosinekinase-inhibitoren vormen een doelgerichte behandeling voor Philadelphia-positieve leukemie
U/μL	De hoeveelheid aan enzym nodig voor de conversie van 1 μmol substraat per minuut
WT	Wildtype (bevat geen puntmutatie)

Abstract

Tyrosinekinase-inhibitoren (TKI) vormen een doelgerichte behandeling voor BCR-ABL1-positieve leukemie. Door het ontstaan van puntmutaties in het kinasedomein van het *BCR-ABL1*-fusiegen kan therapieresistentie optreden. UZ Leuven maakt gebruik van droplet digitale PCR (ddPCR) voor de ABL1-mutatieanalyse.

Commissie Tegemoetkoming Geneesmiddelen keurde recent de terugbetaling van bosutinib (TKI) goed bij afwezigheid van p.V299L- en p.T315I-puntmutaties. Hierdoor is een optimalisatie en validatie nodig van de p.V299L-assay. Elke ddPCR-mutatieanalyse maakt momenteel gebruik van een patiëntenstaal als positieve controle. Omdat dit materiaal eindig is, is het nodig om hiervoor een alternatief te zoeken zoals gBlocks. Deze thesis onderzoekt de manier waarop een juiste gBlock-conditie met een *fractional abundance* (FA) van 0.5% kan aangemaakt worden als alternatief voor de positieve patiëntencontrole. Momenteel gebeurt voor elke TKI-resistente patiënt een mutatieanalyse met zeven ddPCR-reacties. Door assays te *multiplexen*, kan de analysetijd en kost gereduceerd worden.

De optimalisatie en validatie van de p.V299L-assay toont aan dat deze puntmutatie opgespoord kan worden met hetzelfde ddPCR-protocol als de overige zes ABL1-assays. De zeven aangemaakte gBlock-verdunningen leveren een FA van 0.5% op en kunnen de huidige positieve patiëntenstalen vervangen. Het multiplexen van de verschillende assays zorgt voor een reductie van zeven naar drie afzonderlijke ddPCR-reacties. Dit resulteert in een daling van de kost en analysetijd.

Abstract in English

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) are used as targeted therapy for the treatment of BCR-ABL1 positive leukemia. However, point mutations in the kinase domain of the BCR-ABL1 fusion gene can cause therapy resistance. UZ Leuven uses droplet digital PCR (ddPCR) for the ABL1 mutation analysis.

Recently, *Commissie Tegemoetkoming Geneesmiddelen* approved the reimbursement of bosutinib (TKI) in the absence of the p.V299L and p.T315I mutations. This requires an optimization and validation of the p.V299L assay. Currently, each ddPCR mutation analysis uses a patient sample as positive control. Because this material is limited, it is necessary to look for an alternative such as gBlocks. This thesis investigates if a gBlock condition with a fractional abundance (FA) of 0.5% can be generated as an alternative for the positive patient control. For each TKI-resistant patient, a mutation analysis is performed with seven ddPCR reaction. By multiplexing the assays the analysis time and cost can be decreased.

The optimization and validation of the p.V299L assay shows that this point mutation can be detected with the same ddPCR protocol as used for the other six ABL1 assays. For each of the seven assays, the prepared gBlock dilutions yield a FA of 0.5%. These gBlock dilutions can replace the current positive patient samples. Multiplexing the different ddPCR assays results in a reduction from seven to three separate ddPCR reactions and thus reduces the cost and analysis time.

1 Inleiding

1.1 Situering

Deze thesis werd uitgevoerd binnen het Centrum Menselijke Erfelijkheid (CME) van UZ Leuven, campus Gasthuisberg. Het laboratorium voor moleculaire diagnostiek van verworven hematologische en oncologische maligniteiten maakt deel uit van het CME. Deze thesis focust op de detectie van verworven puntmutaties in het ABL1-kinasedomein die zorgen voor resistentie aan doelgerichte therapie [1].

Bij meer dan 95% van de patiënten met chronische myeloïde leukemie (CML) en bij 25% van de patiënten met B-cel acute lymfatische leukemie (B-ALL) is een translocatie t(9;22) aanwezig. Door deze translocatie ontstaat een fusie tussen de sequenties van het *ABL1*-(Abelson proteïne kinase 1) oncogen op chromosoom 9 en de sequenties van *BCR* (*Breakpoint cluster region*) op chromosoom 22. Hierbij worden twee hybridegenen gevormd: *BCR-ABL1* op het Philadelphia chromosoom en *ABL1-BCR* op het 9q+ chromosoom. [2]. Het *ABL1*-gen staat in voor de expressie van een cytoplasmatisch tyrosinekinase. Een tyrosinekinase zorgt voor de transfer van een fosfaatgroep van het gebonden ATP naar een tyrosineresidu van een substraat. Hierdoor worden signaalwegen geactiveerd die betrokken zijn bij de deling, overleving en de proliferatie van de cel. De activiteit van deze proteïnen is meestal strikt gereguleerd waarbij zowel activatie als inhibitie kunnen optreden. Het ontstane *BCR-ABL1*-fusiegen, afkomstig van de translocatie, zorgt voor de expressie van een BCR-ABL1-fusie-eiwit. Het grootste verschil met het *ABL1*-gen is dat een constitutieve activiteit van het ABL1-fusie-eiwit plaatsvindt. Hierdoor ontstaat een abnormale groei en sterke ontwikkeling van leukocyten wat aanleiding geeft tot Philadelphia positieve leukemie [3].

Patiënten met een *BCR-ABL1*-fusiegen worden behandeld met een tyrosinekinase-inhibitor (TKI). Imatinib was de eerste TKI op de markt voor deze toepassing. Ondertussen zijn er al tweede (nilotinib en dasatinib) en zelfs derde generatie inhibitoren (bosutinib en ponatinib) beschikbaar [4]. De inhiberende werking van deze TKI's berust op hun specifieke binding aan het kinasedomein van ABL1. Hoewel deze therapieën zeer succesvol zijn, ontwikkelt een minderheid van de patiënten resistentie aan het gebruikte TKI. Vaak is dit te wijten aan het ontstaan van bepaalde puntmutaties in het kinasedomein van ABL1 waardoor het TKI niet meer of minder goed kan binden. Bij een patiënt die hervalt onder de desbetreffende therapie, is het belangrijk om te bepalen welke puntmutatie aanwezig is in het ABL1-kinasedomein. Dit wordt in UZ Leuven opgespoord met droplet digitale PCR (ddPCR). Op basis van deze info kan de behandelende arts beslissen om de dosis te verhogen of over te stappen naar een ander TKI.

1.2 Probleemstelling

Momenteel worden in de routine diagnostiek zes TKI-resistente mutaties in het kinasedomein van ABL1 opgespoord: p.Q252H, p.Y253H, p.E255K, p.T315I, p.F317L, en p.F359V. Deze zes mutaties zijn gekozen op basis van hun frequentie en relevantie. De ABL1-mutatieanalyse wordt uitgevoerd bij patiënten die niet of niet meer beantwoorden aan de TKI-therapie conform de ELN-richtlijnen (Tabel 1) [5].

Tabel 1: ELN-richtlijnen: beoordeling van de respons op TKI-therapie als eerstelijnsbehandeling

	Optimaal	Waarschuwing	Falen
Bij diagnose	n.v.t.	hoogrisico-sokal/ euroscore of additionele chromo- somale afwijkingen in Ph+-cellen behorend tot de 'major route**	n.v.t.
3 maanden	$BCR-ABL \leq 10\%$ en/of Ph+ $\leq 35\%$	$BCR-ABL > 10\%$ en/of Ph+ 36-95%	non-CHR en/of Ph+ $> 95\%$
6 maanden	$BCR-ABL < 1\%$ en/of Ph+ 0%	$BCR-ABL$ 1-10% en/of Ph1 1-35%	$BCR-ABL > 10\%$ en/of Ph+ $> 35\%$
12 maanden	$BCR-ABL \leq 0,1\%$	$BCR-ABL$ 0,1-1%	$BCR-ABL > 1\%$ en/of Ph+ $> 0\%$
Daarna, onafhankelijk van tijdstip	$BCR-ABL \leq 0,1\%$	klonale chromosomale afwijkingen in Ph-cellen (-7 of 7q-)	verlies van CHR verlies van CCR bevestigd verlies van MMR** mutaties additionele chromosomale afwijkingen in Ph+-cellen

N.v.t.=niet van toepassing, Ph+=philadelphia-positieve metafasen, CHR=complete hematologische respons, CCR=complete cytogenetische respons, MMR=majeure moleculaire respons.
*Chromosoomafwijkingen die vaak voorkomen bij progressie naar acceleratiefase en blastencrisis, namelijk trisomie 8, trisomie Ph+, isochromosoom 17, ((17)(q10)), trisomie 19 en ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11).
**In 2 opeenvolgende testen.

Recent werd, door Commissie Tegemoetkoming Geneesmiddelen, nationaal de terugbetaling van bosutinib, als derde generatie TKI, goedgekeurd voor BCR-ABL1-positieve patiënten waar geen p.V299L- en p.T315I-mutatie aanwezig is. Aangezien de p.V299L-mutatie nog niet geïmplementeerd wordt in de routine diagnostiek, moet een ddPCR-assay voor de p.V299L-mutatie geoptimaliseerd en gevalideerd worden. Er wordt gestreefd naar een test waarmee zowel de p.V299L- als de overige zes ABL1-puntmutaties gelijktijdig geanalyseerd kunnen worden. Dit om de kost en de *turn-around*-tijd zo beperkt mogelijk te houden.

Voor elke mutatieanalyse die wordt uitgevoerd in de routine diagnostiek wordt een eerstelijnscontrole meegenomen. Deze bestaat uit een: positieve controle (PC) in duplo, negatieve controle en *no-template*-controle. Bij voorkeur wordt een cellijn gebruikt als

positieve controle omdat dit een onuitputbare bron van materiaal vormt. Voor verschillende routinetesten is geen positieve cellijn beschikbaar en wordt gebruik gemaakt van een gekende positieve patiënt die verdund wordt tot een *fractional abundance* bereikt wordt van 0.5%. Dit is niet interessant omdat de voorraad aan materiaal beperkt is en dus vaak een nieuwe gekende positieve patiënt gezocht en gevalideerd moet worden. Een alternatief voor de huidige positieve controle is een gBlock. Dit zijn sequentie-geverifieerde, dubbelstrengige genfragmenten van 125 tot 3000 basenparen lang. Deze gBlocks kunnen gebruikt worden voor genconstructie, genmodificatie en in verschillende genetische toepassingen geïmplementeerd worden [6].

Momenteel worden de zeven ABL1-mutaties apart getest met ddPCR. Om deze ABL1-mutatieanalyse efficiënter en goedkoper uit te voeren, wordt gekeken of verschillende assays gepooled kunnen worden (*multiplexen*).

1.3 Doelstellingen

De overkoepelende doelstelling van deze thesis is de validatie van droplet digitale PCR voor de detectie van therapieresistente mutaties in het ABL1-kinasedomein. Eerst en vooral moet een optimalisatie gebeuren van de p.V299L-assay omdat, naar aanleiding van de terugbetaling van bosutinib, de vraag hiernaar dringend is. In een eerste stap wordt getest of het standaardprotocol, waarbij de andere zes puntmutaties worden opgespoord, ook geschikt is voor de analyse van de p.V299L-puntmutatie. Bovendien moet zowel de p.V299L- als de p.T315I-assay volgens hetzelfde protocol gebruikt kunnen worden zodat de detectie van deze twee puntmutaties gelijktijdig kan plaatsvinden. Dit verkort de analysetijd en verlaagt de kosten.

Wanneer de optimale omstandigheden gevonden worden voor de p.V299L- en p.T315I-assay, vindt vervolgens een validatie plaats waarbij de drempelwaarden (thresholds), vals-positieve ratio (FPR), detectielimiet (LOD), juistheid en reproduceerbaarheid worden nagegaan. Vervolgens wordt bepaald of het protocol, gevalideerd voor de p.T315I- en p.V299L-assays, eveneens gebruikt kan worden voor de overige vijf mutatieassays.

Er worden zeven gBlocks besteld. Deze dienen als positieve controle voor de ABL1-mutatieanalyse met ddPCR: p.Q252H, p.Y253H, p.E255K, p.T315I, p.F17L, p.F359V en de te valideren p.V299L. Aangezien de gBlocks puur mutant DNA bevatten, moeten deze eerst verdund worden in een wildtype cellijn. Er wordt gestreefd naar een gBlock-verdunding in de range van de huidige positieve controle. Alvorens een nieuwe positieve controle in routine gebruikt kan worden, moet deze getest worden in vijf onafhankelijke runs om een gemiddelde, een bovengrens en een ondergrens te bepalen.

Om de kost van de ABL1-mutatieanalyse te verminderen, wordt gekeken of verschillende assays gepooled kunnen worden om zo het aantal verschillende ddPCR-reacties te reduceren. Afhankelijk van de positie van de verschillende puntmutaties op het Philadelphia chromosoom kunnen de ABL1-mutatieassays samengevoegd worden. Enkel deze puntmutaties die ver genoeg van elkaar liggen, kunnen theoretisch samen gemultiplexed worden. Door het

multiplexen kan een eerste snelle screening gebeuren. Na een eerste screening kan een meer gedetailleerde analyse worden gestart van een positief staal door gebruik te maken van de singleplexen aanwezig in de positieve multiplex (standaardprocedure).

1.4 Materiaal en methode

Voor de ABL1-mutatieanalyses werd vroeger gebruik gemaakt van een *nested-real-time-PCR* (nRT-PCR) gevolgd door Sanger sequencing. De detectielimiet van Sanger sequencing ligt tussen de 10 - 20% waardoor een opkomende resistente kloon gemist kan worden. Droplet digitale PCR (ddPCR) vormt een interessante alternatieve methode. Deze techniek heeft tal van voordelen waaronder: zeer hoge gevoeligheid, relatief goedkoop en er kan een absolute kwantificatie gebeuren zonder gebruik te maken van een standaardcurve [7] [8].

Voor de optimalisatie van de p.V299L-assay kunnen drie parameters gevarieerd worden: DNA-input, annealingtemperatuur en restrictie-enzym. Wanneer de meest optimale omstandigheden gevonden zijn voor een goede clusterscheiding, wordt de p.V299L-assay gevalideerd.

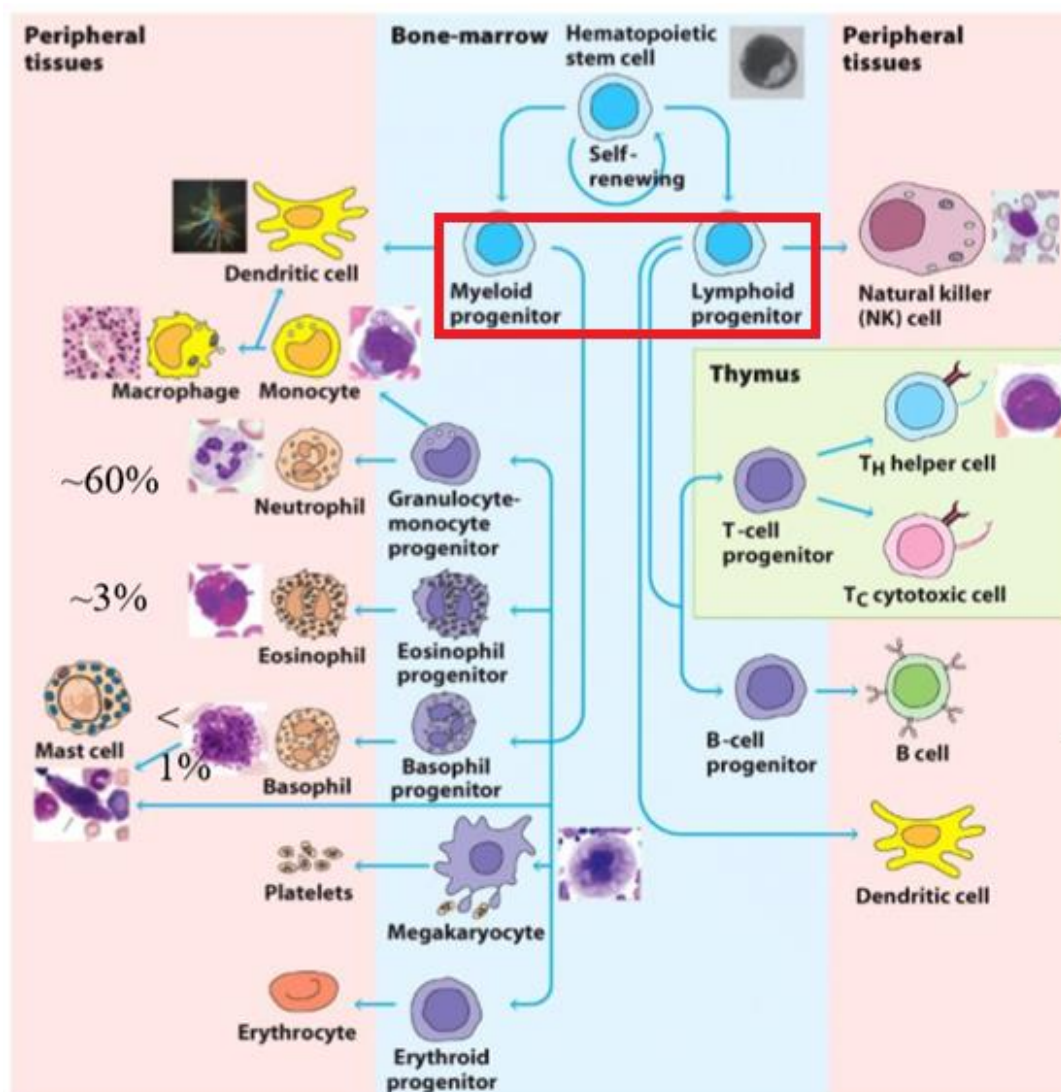
De huidige positieve controles bevatten 0.5% mutant materiaal wat overeenstemt met ongeveer vijf mutante kopijen/ μ L. Deze hoeveelheden worden het liefst aangehouden daarom moeten de gBlocks vooraf verdund worden. Voor de verdunning wordt gewerkt met de DLD-1-celijn en TE-buffer met een pH-waarde van 8.5. Deze buffer met een pH van 8.5 doet dienst als stabilisator voor het zeer laag geconcentreerde DNA.

Afhankelijk van de positie van de verschillende puntmutaties en op basis van de lengte van de verschillende amplicons kan bepaald worden welke assays binnen de reactiemix gepooled kunnen worden zonder dat overlap plaatsvindt tussen de aangemaakte PCR-fragmenten. Om de kosten verder te drukken, worden de gBlocks nadien ook gemultiplexed. Als laatst zal ook getest worden of een reductie van het volume aan primer/probe-assay binnen de reactiemix mogelijk is.

2 Literatuurstudie

2.1 Hematopoïese

Hematopoïese duidt op de vorming van alle bloedcellen waaronder de leukocyten, erythrocyten en megakaryocyten. Dit is een steady-state reactie waaruit mature bloedcellen ontstaan aan eenzelfde snelheid als waarop ze verdwijnen door apoptose. Er worden twee groepen van voorlopercellen onderscheiden (Figuur 1): myeloïde en lymfoïde progenitorcellen.



Figuur 1: Voorstelling hematopoïese: myeloïde en lymfoïde progenitorcellen (rood omkaderd) [9]

De myeloïde progenitorcellen staan in voor de vorming van erythrocyten, granulocyten, monocyten en megakaryocyten terwijl de lymfoïde progenitorcellen verantwoordelijk zijn voor de vorming van B-cellen, T-cellen en natural killer-cellen (NK) [9].

2.2 Leukemie

Leukemie is in de volksmond bekend onder de naam bloedkanker. Het is een kanker die zich vormt op het niveau van leukocyten in het beenmerg. Hierbij verwerft een lichaamseigen cel de eigenschap om zich ongecontroleerd te delen wat resulteert in een te hoog aantal witte bloedcellen. De meest voorkomende symptomen bij leukemie zijn: bloedingen, blauwe plekken, koorts en een verhoogde kans op het krijgen van infecties. Deze symptomen treden op door een gebrek aan een normaal gehalte van de andere cellen in het bloed. De oorzaak van leukemie is tot nu toe nog niet exact bekend. Een combinatie van genetische factoren en omgevingsfactoren worden gerelateerd aan deze ziekte. Net als voor andere kankers, komt leukemie vaker voor bij mensen die roken of blootgesteld zijn aan radioactieve straling of chemische stoffen zoals benzeen [10].

Afhankelijk van het stadium van de leukemiecél wordt een onderscheid gemaakt tussen acute en chronische leukemie. Bij acute leukemie vindt een ongecontroleerde celgroei plaats van immature leukocyten. Bij chronische leukemie gaat het over mature witte bloedcellen. Op basis van het celtype kunnen acute en chronische leukemiën verder onderverdeeld worden in een lymfatische en myeloïde vorm waarbij de leukemie ontstaat uit respectievelijk een lymfoïde en een myeloïde voorlopercel [11]. Uitgaande van deze kenmerken kunnen vier grote groepen onderscheiden worden: acute lymfatische leukemie (ALL), acute myeloïde leukemie (AML), chronische lymfatische leukemie (CLL) en chronische myeloïde leukemie (CML). ALL is de meest voorkomende vorm van leukemie bij kinderen en jongeren. Dit type van leukemie komt zelden voor bij hogere leeftijdscategorieën. Bij de oudere bevolking treden AML, CML en CLL dan weer voornamelijk op [12].

2.3 Philadelphia chromosoom positieve leukemie

2.3.1 Reciproke translocatie tussen chromosoom 9 en 22

Bij meer dan 95% van de patiënten met chronische myeloïde leukemie (CML) en bij 25% van de patiënten met B-cel acute lymfatische leukemie (B-ALL) is een *BCR-ABL1*-fusiegen aanwezig. Door het optreden van een fout tijdens de mitosestap van de celdeling kan een reciproke translocatie ontstaan tussen chromosoom 9 en 22. Deze twee chromosomen gaan onderling genetische fragmenten uitwisselen waardoor een fusiegen gevormd wordt.

2.3.1.1 Abelson proteïne kinase 1

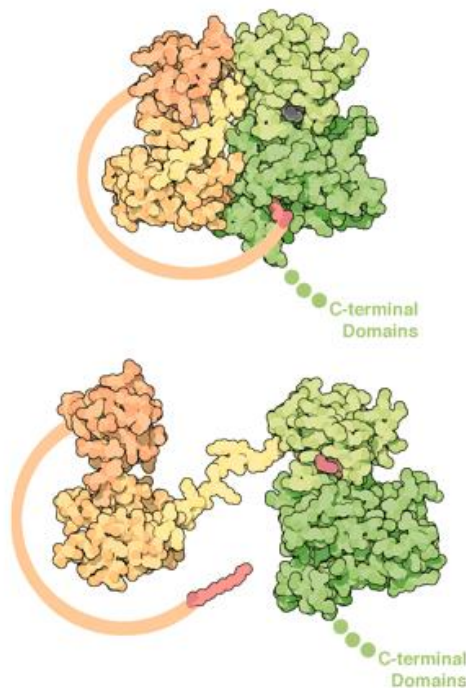
Het gen dat codeert voor Abelson proteïne kinase 1, c-ABL, of kortweg ABL1 bevindt zich op chromosoom 9. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen twee soorten tyrosinekinasen: deze die functioneren als een membraanreceptor (EGFR, PDGFRA, FGFR1, etc.) en deze die zich cytoplasmatisch in de cel bevinden (ABL1, SRC, JAK2 etc.). Een tyrosinekinase katalyseert de overdracht van een fosfaatgroep van ATP naar een tyrosineresidu van een substraat.

Het ABL1-eiwit vertoont een complexe conformatieverandering om zijn activiteit te kunnen reguleren. Deze regulering kan plaatsvinden door gebruik te maken van verschillende domeinen die gekoppeld zijn aan elkaar door 'linkers' zoals weergegeven in Figuur 2 en Figuur 3.



Figuur 2: Domeinen van ABL1-eiwit: regulatorische domeinen (SH2, SH3), tyrosinekinasedomein (TK) en DNA- en actinebindingsdomein (DB, AB) [13]

Het ABL1-proteïne is opgebouwd uit twee regulatorische domeinen (SH2 en SH3), een tyrosinekinasedomein (TK) en andere domeinen die DNA (DB) en actine (AB) binden.



Figuur 3: Werking inactief en actief c-ABL-eiwit: bovenaan: inactief c-ABL-eiwit waar SH2-en SH3-domein (rood) gebonden zijn aan TK-domein (groen) en onderaan: actief c-ABL-eiwit waar SH2- en SH3-domein loskomen van TK-domein [14]

In de inactieve conformatie neemt ABL1 een bolvormige, gesloten structuur aan waarbij de regulatorische domeinen (SH2, SH3) gebonden zijn aan het tyrosinekinasedomein (TK). Het ABL1-proteïne wordt pas geactiveerd door andere eiwitten die interageren met de regulatorische domeinen. Hierdoor komen de regulatorische domeinen los van het kinasedomein waardoor de actieve zijde van het ABL1-eiwit vrijkomt. Het enzym heeft nu een open, actieve conformatie aangenomen zoals weergegeven wordt in Figuur 3 [14].

In deze actieve conformatie kan ATP binden aan de ATP-bindingsplaats. Vervolgens zorgt het ABL1-eiwit voor de transfer van een fosfaatgroep van het gebonden ATP naar een tyrosineresidu van het substraat. Het gefosforyleerde substraat kan op zijn beurt verschillende signaalwegen activeren die betrokken zijn bij de proliferatie, deling en overleving van de cel [15].

2.3.1.2 Breakpoint cluster region

Breakpoint cluster region-gen (*BCR*-gen) is gelegen op chromosoom 22 en codeert voor een cytoplasmatisch fosfoproteïne met verschillende actieve domeinen zoals weergegeven in Figuur 4.

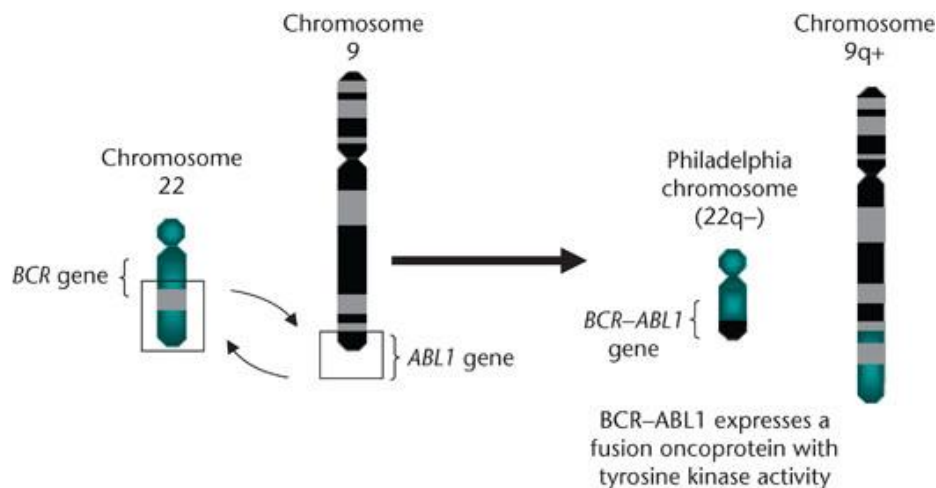


Figuur 4: Domeinen *BCR*-eiwit met: oligomerisatiedomein (*OLI*), serine/threoninekinasedomein (*S/TK*), guanine nucleotide exchange factors (*DH*) en *Rac GAP*-proteïne [13]

Een eerste domein is een oligomerisatiedomein (zie verder §2.3.1.3). Het tweede domein is verantwoordelijk voor de serine/threoninekinase-activiteit (*S/TK*) waarbij de hydroxylgroep van serine of threonine gefosforyleerd wordt. Deze fosforylatie speelt een belangrijke rol in signaaltransducties en in post-translationele modificatie. Een ander actief domein van *BCR* is een intern domein dat betrokken is bij de controle van de celdeling na replicatie van het DNA. Het voorlaatste actief domein zijn de *guanine nucleotide exchange factors* (*GEFs*). De *GEFs* zijn verantwoordelijk voor de activatie van GTP-ase van het *Rac*-proteïne (laatste domein). Door deze activiteit wordt het *BCR*-proteïne geholpen met het reguleren van de migratie van cellen [16]. Bovendien bevat het *BCR*-eiwit ook nog verschillende *SH2*-bindingsplaatsen.

2.3.1.3 *BCR-ABL1*-fusiegen

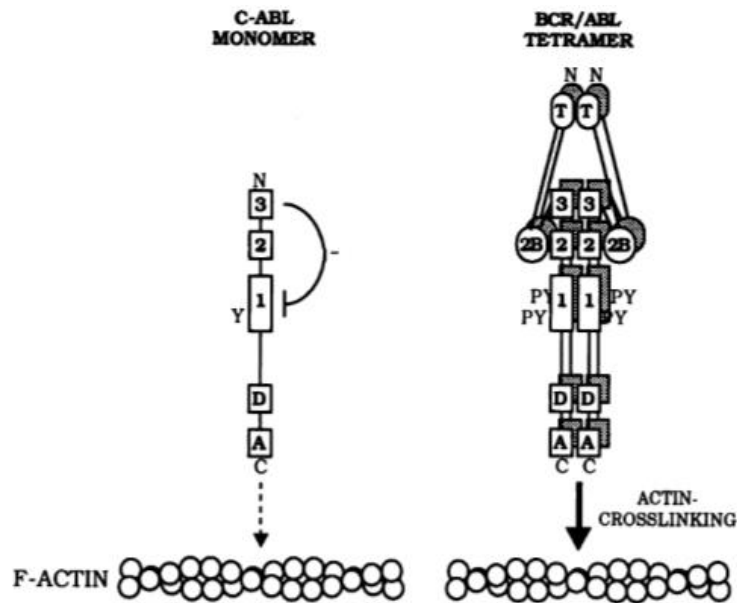
Een fusie van het *ABL1*- en het *BCR*-gen ontstaat door een reciproke translocatie $t(9;22)$, weergegeven in Figuur 5.



Figuur 5: Vorming twee hybridegenen door translocatie $t(9;22)$: *ABL1-BCR* op $9q+$ en *BCR-ABL1* op Philadelphia chromosoom (verkort chromosoom 22) [17]

Tijdens deze translocatie worden twee hybridegenen gevormd: *BCR-ABL1* op het Philadelphia chromosoom (afwijkend verkort chromosoom 22) en *ABL1-BCR* op $9q+$. De breekpunten in chromosoom 9 liggen in het grote intron van 200 kilobasen tussen exon 2 en exon 3 van *ABL1*, terwijl de breekpunten in *BCR* op chromosoom 22 erg kunnen variëren [2].

Het ontstane *BCR-ABL1*-fusiegen codeert voor het BCR-ABL1-fusie-eiwit dat functionaliteiten van beide eiwitten bevat (Figuur 6).



Figuur 6: Vorming BCR-ABL-tetrameer met: links: c-ABL-monomeer en rechts: tetramerisatiedomein en intermoleculaire cross-fosforylatie van ABL1-tyrosinekinase met: 3) SH3-domein, 2) SH2-domein, 1) tyrosinekinasedomein, D) DNA-bindingsdomein, A) actinebindingsdomein, T) tetramerisatiedomein, 2B) SH2-bindingsplaats [18]

Het N-terminale deel van het BCR-eiwit bevat een oligomerisatiedomein dat zorgt voor de vorming van een BCR-ABL1-tetrameer met twee BCR- en twee ABL1-ketens. Het kinasedomein van ABL1 is eveneens aanwezig in de fusie. De tetrameervorming van BCR-ABL1 zorgt ervoor dat de twee ABL1-kinasedomeinen in elkaars nabijheid worden gebracht en elkaar zo activeren door een *cross-fosforylatie*. Dit levert een hyperactief ABL1-kinase op dat continu zijn signaalwegen activeert wat uiteindelijk resulteert in een ongecontroleerde celgroei. In de meeste gevallen ontstaat zo chronische myeloïde leukemie en in mindere mate B-cel-acute lymfatische leukemie [14], [18].

2.3.2 Philadelphia chromosoom positieve leukemie

2.3.2.1 BCR-ABL1-positieve chronische myeloïde leukemie

Zoals eerder vermeld in §2.2, is chronische myeloïde leukemie (CML) een kwaadaardige proliferatie van myeloïde precursoren in het beenmerg. Bij 95% van de gevallen wordt deze ziekte gekarakteriseerd door een chromosomale translocatie t(9;22) waarbij het *BCR-ABL1*-fusiegen gevormd wordt. Bij CML wordt het *BCR-ABL1*-fusiegen teruggevonden in alle myeloïde cellen en in mindere mate in sommige lymfoïde cellen en endotheelcellen.

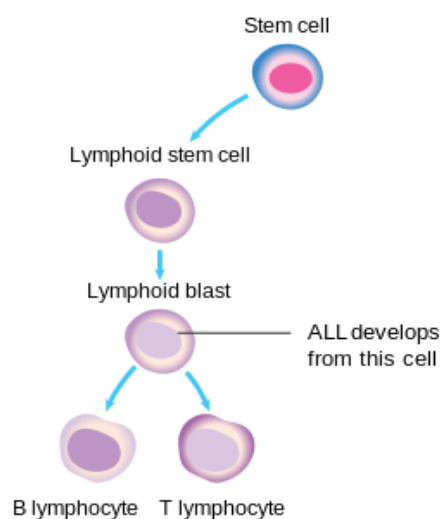
Er wordt een onderscheid gemaakt tussen drie verschillende fasen van de ziekte naargelang het aantal immature witte bloedcellen (blasten), veroorzaakt door het BCR-ABL1-eiwit: een chronische fase (CP) met minder dan 10% blasten, een acceleratie fase (AP) met 10 – 19% blasten en een gevorderde blasten fase (BP) met meer dan 20% blasten. De BP wordt ook wel

de acute fase genoemd en lijkt sterk op een acute myeloïde leukemie. Deze toename van het aantal blasten wordt veroorzaakt door een vermogensverlies van de myeloïde voorlopercellen om uit te groeien tot mature witte bloedcellen.

De meest voorkomende symptomen van chronische myeloïde leukemie zijn splenomegalie, een vol gevoel na de maaltijden en in mindere mate malaise dat gepaard gaat met: infecties, koorts en gewichtsvermindering [19]. De diagnose wordt meestal toevallig gesteld in de chronische fase van de ziekte tijdens een routine bloedonderzoek. Voor de behandeling van CML worden tyrosinekinase-inhibitoren gebruikt (zie verder §3.4.2). Hoewel deze TKI's een goede werking vertonen tijdens de chronische fase, blijft de werking van deze TKI's in de acceleratie fase en in de blasten fase eerder beperkt. Dit wordt toegeschreven aan een gewijzigd expressieprofiel gedurende de progressie van de CP naar de AP of de BP [20].

2.3.2.2 BCR-ABL1-positieve B-cel acute lymfatische leukemie

B-cel acute lymfatische leukemie (B-ALL) is een neoplasie van immature lymfoblasten die normaal zorgen voor de aanmaak van B-cellen. Bij 25% van de volwassenen met B-ALL is een t(9;22) aanwezig. De ziekte wordt gekenmerkt door een overproductie van immature B-lymfocyten (Figuur 7).



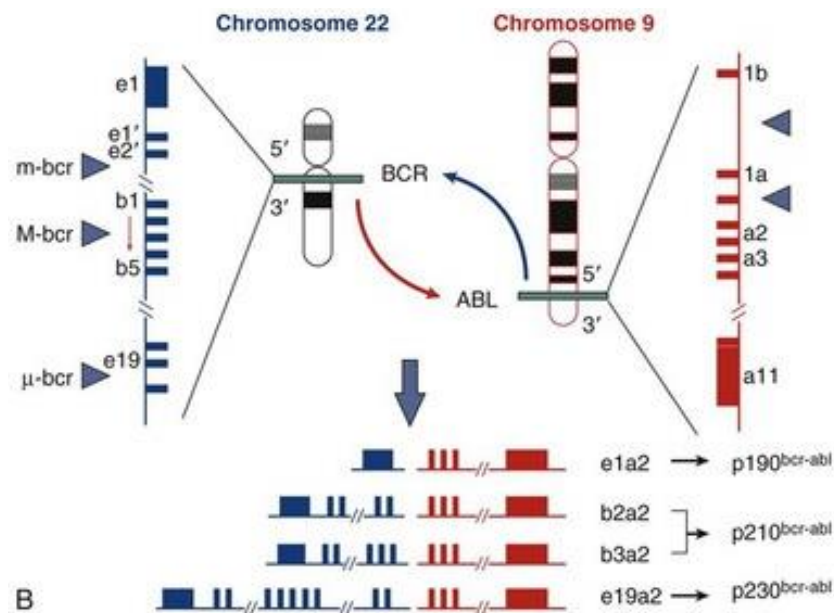
Figuur 7: Overproductie van immature B-lymfocyten leidt tot B-cel ALL [21]

Deze cellen stapelen zich op in het beenmerg en verstoren zo de aanmaak van de normale bloedcellen. De meest voorkomende symptomen hierdoor zijn: bloedarmoede, een verhoogde kans op bloedingen en een verhoogde vatbaarheid voor infecties [22].

2.3.3 Opsporen Philadelphia chromosoom

Cytogenetica houdt zich bezig met het opsporen van genetische afwijkingen op het niveau van de chromosomen zoals translocatie t(9;22), die aanleiding geeft tot de vorming van het Philadelphia chromosoom. Zowel het aantal chromosomen als hun structuur worden nagegaan.

Door gebruik te maken van moleculaire technieken (o.a. *real-time* PCR) kunnen afwijkingen op het niveau van individuele basen opgespoord worden (Figuur 8).



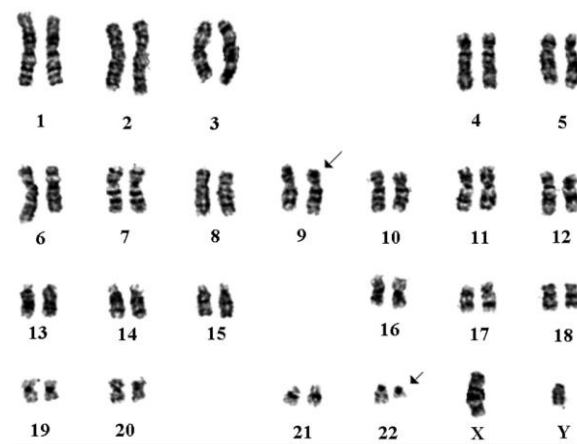
Figuur 8: Vorming van verschillende fusietranscripten: b3a2, b2a2, a19a2 (voornamelijk CML) en e1a2 (voornamelijk B-ALL) [23]

De aanwezigheid van het Philadelphia chromosoom (Ph⁺) is een majeur criterium voor de diagnose van CML. Dit kan worden aangetoond met behulp van cytogenetische technieken of moleculair onderzoek. Het breekpunt op chromosoom 9 ligt in het grote intron tussen exon 1b en exon 2 (a2) van *ABL1*. De breekpunten in het *BCR*-gen lokaliseren zich in de centrale regio of de *major breakpoint cluster region* (M-bcr) tussen *BCR*-exons 13 en 15 (b2 en b4). Afhankelijk van de positie van het breekpunt in het *BCR*-intron 13 of 14, zijn verschillende *BCR-ABL1*-fusies mogelijk. Enerzijds *BCR*-exon b2 met het *ABL1*-exon a2 wat resulteert in een b2a2-junctie en anderzijds *BCR*-exon b3 met *ABL1*-exon a2 wat resulteert in een b3a2-junctie. De meerderheid van de CML-patiënten hebben een b3a2 (55%)- of b2a2-junctie (40%). In 5% van de gevallen kan door een alternatieve splitsing zowel een b3a2-junctie als een b2a2-junctie gelijktijdig voorkomen. Bij een minderheid van de CML-patiënten wordt een fusie gevormd door breekpunten gelegen in de *micro breakpoint cluster region* (μ-bcr) tussen exon 19 en 20 met *ABL1*-exon 2 wat resulteert in een e19a2-junctie [24].

In tegenstelling tot CML is de aanwezigheid van het Philadelphia chromosoom geen majeur criterium voor de diagnose van B-ALL. Dit omdat naast Ph⁺ ALL nog andere B-ALL-subgroepen zijn. Voor de diagnose Ph⁺ALL is de aanwezigheid van het Philadelphia chromosoom wel vereist. De breekpunten op chromosoom 9 bevinden zich in het grote intron tussen exon 1 en exon 2 (a2) van *ABL1*. Voor *BCR*, gelegen op chromosoom 22, bevindt het breekpunt zich in de *minor breakpoint cluster region* (m-bcr), gelegen tussen twee alternatieve exonen en exon 2 van *ABL1*. Dit resulteert in een e1a2 junctie (Figuur 8) [25]. De onderverdeling in juncties tussen CML en B-ALL is niet absoluut. Er zijn sporadisch ook CML-patiënten met een e1a2 junctie, net zoals er B-ALL-patiënten zijn met een b2/b3a2-junctie.

2.3.3.1 Cytogenetica

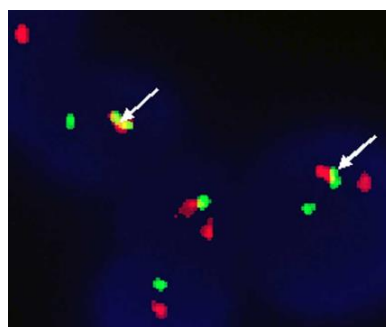
In de cytogenetica wordt een onderscheid gemaakt tussen karyotypering en FISH (fluorescente in situ hybridisatie). Karyotypering is de gangbare methode die gebruikt wordt voor het opsporen van translocaties (Figuur 9). Hierbij worden de chromosomen van de patiënt in kaart gebracht tijdens de metafase van de celdeling.



Figuur 9: Karyotypering voor opsporen van translocatie $t(9;22)$ aangeduid met pijlen: Philadelphia chromosoom wordt gekenmerkt door een verkort chromosoom 22 [26]

De chromosomen worden gefixeerd op een glasplaat en nadien onderworpen aan een kleuringsmethode die zorgt voor een typerend bandenpatroon op elk chromosoom. Vervolgens worden de homologe chromosomen bij elkaar gebracht en de chromosomenparen gerangschikt naar grootte en vorm. Hieruit kunnen afwijkingen in het chromosoom vastgesteld worden [27].

Dual-color-FISH is een alternatieve techniek die enkel toegepast wordt wanneer een snelle opsporing moet gebeuren of wanneer chromosomale wijzigingen aanwezig zijn die moeilijk zichtbaar zijn met karyotypering (Figuur 10).



Figuur 10: Detectie Philadelphia chromosoom met dual-color-FISH: groen (*BCR*) en rood (*ABL1*) fluorescerende probes [28]

Hierbij wordt gebruikt gemaakt van twee verschillende fluorescerende probes: een groene fluorescent-gelabelde probe complementair aan het *BCR*-gen en een rode fluorescent-gelabelde probe complementair aan het *ABL1*-gen. In een normale metafase worden twee rode signalen waargenomen afkomstig van het *ABL1*-gen en twee groene signalen afkomstig van het *BCR*-gen. Bij de aanwezigheid van het Philadelphia chromosoom wordt twee keer een combinatie van het groene en rode signaal waargenomen [27] [28].

2.3.3.2 Moleculaire technieken

Voor een eerste kwalitatieve screening of opsporing van het BCR-ABL1-fusietranscript, afkomstig van de translocatie t(9;22), kan gebruik gemaakt worden van *reverse transcriptase-PCR* (RT-PCR) op cDNA-niveau. Na de PCR-reactie wordt het PCR-product geanalyseerd. Bij de aanwezigheid van het Philadelphia chromosoom, kan een fragment waargenomen worden. Op basis van de grootte van het fragment kan een onderscheid gemaakt worden tussen de verschillende mogelijke fusietranscripten: e1a2, b2a2, b3a2 en e19a2 (zie §2.3.2) [29].

Wanneer een kwalitatieve screening met een RT-PCR een positief resultaat oplevert, wordt het fusietranscript gekwantificeerd met kwantitatieve real-time PCR. Hierbij wordt gebruik gemaakt van gelabelde probes (TaqMan-principe). Een kwantitatieve PCR-reactie biedt het voordeel dat een nauwkeurige moleculaire *follow-up* kan gebeuren op basis van een kwantitatief resultaat bij patiënten die behandeld worden. Hierbij kan bepaald worden wanneer de behandeling aanslaat of wanneer overgeschakeld moet worden naar een andere behandeling.

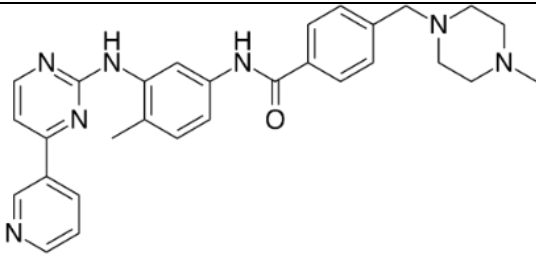
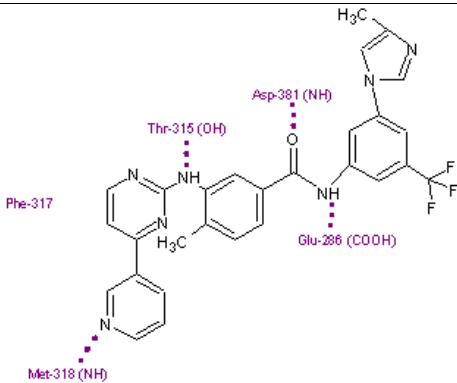
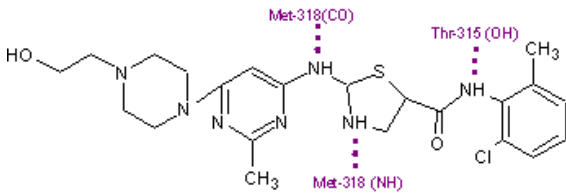
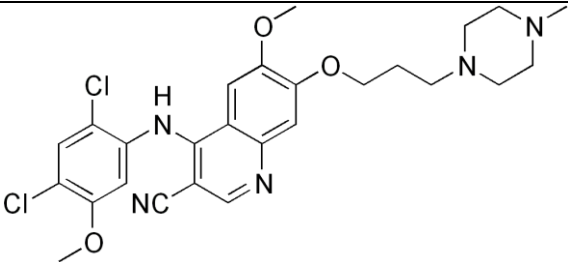
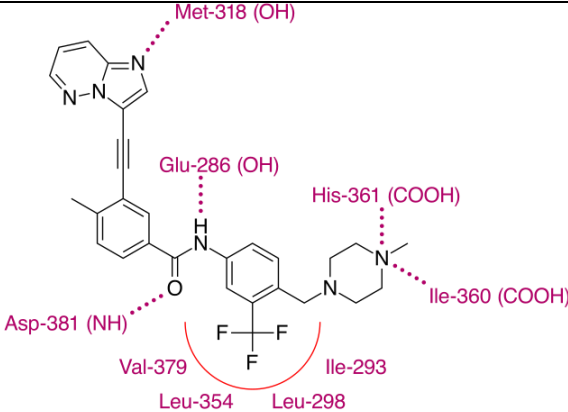
2.3.4 Behandeling Philadelphia chromosoom positieve leukemie

Voor de ontdekking van het Philadelphia chromosoom berustte de behandeling van B-ALL en CML op het toedienen van een hoge dosis aan niet-doelgerichte chemotherapie (hydroxyurea) gevolgd door stamceltransplantatie. Om alle nadelen van chemotherapie in combinatie met stamceltransplantatie te elimineren, werd gericht gezocht naar een alternatieve therapie. Idealiter wordt een therapie gebruikt, gericht tegen datgene wat leukemie drijft. De ontdekking van het Philadelphia chromosoom was de eerste stap. Eens het *BCR-ABL1*-fusiegen geïdentificeerd werd, kon het werkingsmechanisme ontrafeld worden en heel doelgericht gezocht worden naar een behandeling die hiermee interfereert.

De introductie van tyrosinekinase-inhibitoren (zie Tabel 2) voor de behandeling van CML heeft ervoor gezorgd dat CML een echte chronische ziekte is geworden. Momenteel is de gemiddelde levensverwachting van een CML-patiënt nagenoeg dezelfde als bij zijn gezonde leeftijdsgenoten [30]. De CML-patiënten worden enkel behandeld met deze TKI's terwijl bij de Phi+-B-ALL-patiënten een combinatie van TKI-behandeling met chemotherapie nog noodzakelijk blijft.

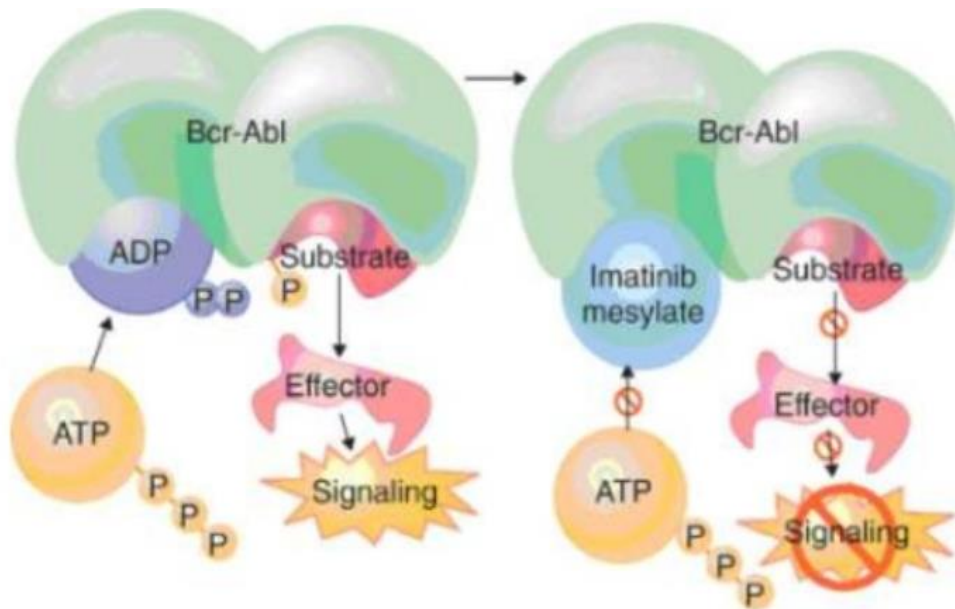
De eerste TKI, gericht tegen het BCR-ABL1-proteïne, die op de markt kwam, was imatinib (Gleevec®, Novartis Oncology, East Hanover, NJ) gevolgd door dasatinib (Sprycel®, Bristol-Meyers Squibb Company, Princeton, NJ) en nilotinib (Tasigna®, Novartis Oncology, East Hanover, NJ). Nadien in 2012 volgden bosutinib (Bosulif®, Pfizer, New York, NY) en ponatinib (Iclusig®, Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA) [31].

Tabel 2: Voorstelling structuurformules van tyrosinekinase-inhibitoren

<p>Imatinib [32]</p>	 <p>The structure of Imatinib consists of a central benzene ring substituted with a 4-pyridin-2-ylamino group, a 4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide group, and a 4-pyridin-2-yl group.</p>
<p>Nilotinib [32]</p>	 <p>The structure of Nilotinib is shown with several amino acid residues indicated by dotted lines: Met-318 (NH), Phe-317, Thr-315 (OH), Asp-381 (NH), Glu-286 (COOH), and Met-318 (CO).</p>
<p>Dasatinib [32]</p>	 <p>The structure of Dasatinib is shown with several amino acid residues indicated by dotted lines: Met-318 (CO), Met-318 (NH), and Thr-315 (OH).</p>
<p>Bosutinib [32]</p>	 <p>The structure of Bosutinib features a central benzimidazole ring system substituted with a 2,4-dichloro-6-methoxyphenyl group, a 4-(4-methylpiperazin-1-yl)oxy group, and a cyano group.</p>
<p>Ponatinib [32]</p>	 <p>The structure of Ponatinib is shown with several amino acid residues indicated by dotted lines: Met-318 (OH), Glu-286 (OH), His-361 (COOH), Ile-360 (COOH), Val-379, Leu-354, Leu-298, and Ile-293.</p>

2.3.4.1 Eerste generatie TKI

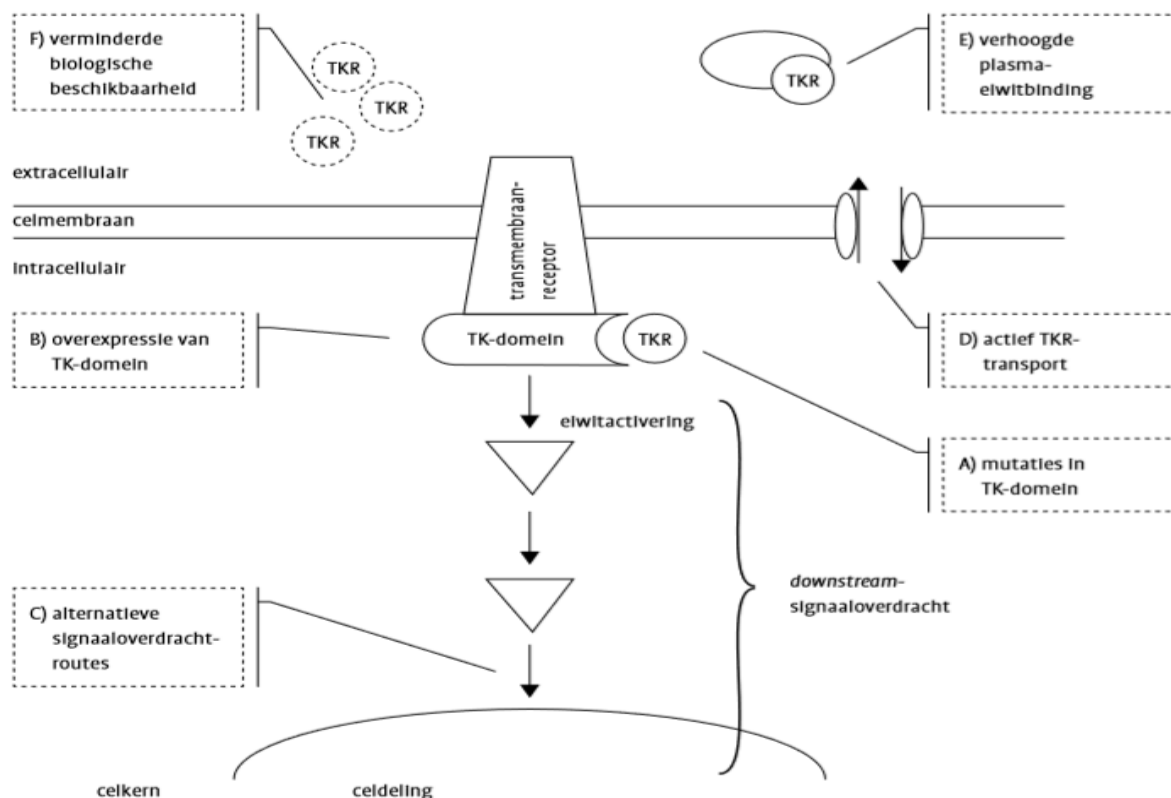
Om tot de structuur van imatinib te komen, werd eerst een screening uitgevoerd van verschillende componenten die functioneren als inhibitor van proteïnenkinasen. Van hieruit werden derivaten aangemaakt en uitgetest. Zo werd uiteindelijk imatinib ontwikkeld (Figuur 11) [33], [34], [35].



Figuur 11: Werking inhibitie met imatinib: links: ATP bindt aan ABL1-kinasedomein en fosforyleert het substraat en rechts: imatinib bindt aan ABL1-kinasedomein waardoor substraat niet geactiveerd wordt omdat ATP niet kan binden [36]

Imatinib bindt, met behulp van zes waterstofbrugkrachten, aan het ABL1-kinasedomein in zijn inactieve conformatie. In deze inactieve conformatie gaat imatinib rechtstreeks in competitie met ATP op de ATP-bindingsplaats en zorgt ervoor dat geen katalytische activiteiten meer kunnen plaatsvinden [36].

De introductie van imatinib voor de behandeling van CML-patiënten was een mijlpaal voor de behandeling van leukemiën. Na zes jaar behandeling met de eerste generatie TKI, waren 90% van de patiënten nog in leven en werd bij 95% van de gevallen een daling van het BCR-ABL1-tyrosinekinase waargenomen. Hoewel de werking van imatinib veelbelovend was, was een minderheid van de patiënten genoodzaakt om te stoppen met de behandeling omwille van bijwerkingen of omwille van een onvoldoende respons. Overige patiënten vertoonden dan weer resistentie. Deze therapieresistentie is enerzijds te wijten aan BCR-ABL1-afhankelijke en anderzijds aan BCR-ABL1-onafhankelijke mechanismen zoals weergegeven in Figuur 12 [37].



Figuur 12: Resistentiemechanisme tegen imatinib: BCR-ABL1-afhankelijke (A,B) en onafhankelijke (C, D, E, F) resistentiemechanismen [38]

BCR-ABL1-onafhankelijke mechanismen zijn divers. Zo kunnen bijkomende chromosomale afwijkingen binnen de maligne cellen zorgen voor alternatieve routes van signaaloverdracht (C) (*downstream-signaling*). Dit veroorzaakt een omzeiling van de remming door imatinib en zo wordt resistentie voor deze TKI ontwikkeld. Het SRC-proteïne is een bekend voorbeeld van een kinase dat aanwezig is in de *downstream*-signaalroute. Een ander BCR-ABL1-onafhankelijk mechanisme is de intracellulaire concentratie van imatinib die gewijzigd wordt. Bij een gevorderd stadium van CML blijkt de expressie van het P-glycoproteïne (transportproteïne) verhoogd te zijn. Hierdoor vindt een verhoogde cellulaire efflux plaats van imatinib uit maligne cellen (D). Bovendien kan een verlaagde influx door organische kationtransporters ook een significante rol spelen in de ontwikkeling van resistentie. Resistentie kan ook plaatsvinden door een verhoogde plasma-eiwitbinding (E). Imatinib is voor 95% gebonden aan plasma-eiwitten, de overblijvende vrije fractie is beschikbaar voor de opname in de cellen. Wanneer een verhoogde plasma-eiwitconcentratie aanwezig is, kan de concentratie aan imatinib verlaagd zijn. Een verhoogde expressie van een iso-enzym afkomstig van cytochroom P450 (CYP450), namelijk CYP3A4 bevordert BCR-ABL1-onafhankelijke resistentie. Het enzym CYP3A4 staat in voor de omzetting van lichaamsvreemde stoffen. Een variabiliteit in de plasmaconcentraties van imatinib is deels te wijten door verschillen in expressie van het CYP3A4-enzym (F).

Onder BCR-ABL1-afhankelijke mechanismen wordt enerzijds de overexpressie van het *BCR-ABL1*-gen door genamplificatie verstaan (B). Deze toename in expressie van het BCR-ABL1-tyrosinekinase door genamplificatie leidt tot een toegenomen signaaloverdrachtniveau.

Hierdoor worden de cellen minder gevoelig voor de standaarddosering. Een toenemende expressie wordt vooral waargenomen in een vergevorderd stadium van CML. Anderzijds treedt BCR-ABL1-afhankelijke resistentie op door de aanwezigheid van puntmutaties in het ABL1-kinasedomein binnen het fusiegen (A). Deze puntmutaties kunnen onderverdeeld worden in vier groepen naargelang de positie waar de aminozuurveranderingen in het ABL1-kinasedomein plaatsvindt. De P-loop vormt de eerste regio. De P-loop is een sterk geconserveerd domein en is verantwoordelijk voor de fosfaatbinding. Deze regio is gelegen tussen aminozuurpositie 244 en 255. Een tweede regio bevindt zich op threonine op positie 315. Het threonine is verantwoordelijk voor de waterstofbrugvorming met imatinib. Wanneer dit AZ gesubstitueerd wordt (door een puntmutatie), kan niet langer een binding plaatsvinden met het TKI. In dezelfde regio wordt ook vaak de p.F317L-puntmutatie teruggevonden, ook hier daalt de gevoeligheid voor het gebruikte TKI. Een derde regio situeert zich binnen het katalytisch domein gelegen tussen de aminozuren op positie 351 en 355. Tot slot treden ook mutaties op in de A-loop. Deze activatie-loop zorgt ervoor dat het tyrosinekinase zijn inactieve vorm kan aannemen. Wanneer hier mutaties optreden kan geen inactieve conformatie meer aangenomen worden, terwijl dit wel noodzakelijk is voor de binding met imatinib [39]. Deze puntmutaties kunnen al aanwezig zijn bij de start van de behandeling of kunnen tijdens de behandeling zelf ontstaan als ontsnappingsmechanisme van de kankercel [38], [40].

2.3.4.2 Tweede generatie TKI's

Door de rapporten over therapieresistentie voor imatinib, werd een zoektocht gestart naar alternatieve inhibitoren. Zo werden in 2006 en 2007 dasatinib en nilotinib op de markt gebracht. Beide inhibitoren remmen de activiteit van het BCR-ABL1-tyrosinekinase bij een veel lagere concentratie in vergelijking met imatinib. Voor dasatinib is dit verschil 325-voudig en voor nilotinib 25-voudig [5].

Nilotinib werd ontwikkeld, vertrekkende van imatinib en de structuur van het ABL1-imatinib-complex. De werking berust op hetzelfde principe als imatinib; er wordt vooral ingespeeld op de ATP-bindingsplaats van het *BCR-ABL1*-gen wat leidt tot een inhibitie van de fosforylatie van eiwitten in de intracellulaire signaalweg. De selectiviteit en de potentie van imatinib kon verbeterd worden door de imatinib-bindingssite op het ABL1-kinasedomein beter op te vullen door in te spelen op de lipofiliciteit. Op basis hiervan werd nilotinib ontwikkeld [41]. De lipofiliciteit speelt een belangrijke rol in de fysicochemische eigenschappen wat betreft: absorptie, metabolisme, toxiciteit, distributie en excretie van een geneesmiddel. Door deze eigenschap te controleren, kon de kwaliteit en de effectiviteit van het geneesmiddel verbeterd worden.

Dasatinib werd oorspronkelijk ontwikkeld als een inhibitor voor het SRC-kinase-eiwit. Het bleek ook andere tyrosinekinasen (zoals ABL1) en serine/threoninekinasen (zoals c-mitogen) te inhiberen. Dit maakt van dasatinib een multitargetremmer van ABL1- en SRC-familie-tyrosinekinasen. Hierdoor wordt het downstream-resistentiemechanisme grotendeels vermeden. Deze TKI inhubeert de proliferatie en de kinase-activiteit van BCR-ABL1

driehonderd keer krachtiger dan imatinib. Bovendien kan dasatinib zowel in zijn actieve als in zijn inactieve conformatie binden aan het ABL1-kinasedomein. Dit verklaart zijn hogere effectiviteit maar zorgt ook voor een verminderde selectiviteit vergeleken met de andere TKI's. Daarnaast vormt dasatinib geen substraat voor het P-glycoproteïne waardoor geen verhoogde efflux plaatsvindt (zie BCR-ABL1-onafhankelijk mechanisme).

Hoewel de tweede generatie TKI's meer potentie garandeert dan imatinib, werd ook tegen nilotinib en dasatinib resistentie ontwikkeld. Een deel van de resistente puntmutaties overlapt met de imatinib-resistente puntmutaties zoals de p.T315I-mutatie. Door hun specifieke binding aan het ABL1-kinasedomein zijn er andere bijkomende resistentiegevoelige bindingsplaatsen aanwezig.

2.3.4.3 Derde generatie TKI's

Aangezien er goede resultaten verkregen werden met dasatinib, als multitargetremmer van zowel SRC- als ABL1-tyrosinekinase, werd een gelijkaardig derivaat ontwikkeld met zowel een ABL1- als een SRC-inhiberende activiteit. Dit leidde tot de ontwikkeling van bosutinib. Bosutinib gedraagt zich enerzijds als een substraat en anderzijds als een inhibitor van het P-glycoproteïne en CYP3A4-proteïne. Door de gedeeltelijke inhiberende werking, treedt een stijging op van de plasmaspiegel van bosutinib. Zoals eerder (resistentiemechanismen) werd vermeld, zorgt het P-glycoproteïne en het CYP3A4 ervoor dat fluctuaties optreden in de plasmaconcentratie waardoor de concentratie aan TKI kan dalen [42].

Ponatinib is een tyrosinekinaseremmer voor de behandeling van volwassen patiënten die resistent of intolerant werden ten opzichte van eerdere TKI-therapie. Ponatinib werd ontwikkeld door gebruik te maken van *ARIAD-drug-design platvorm*. Hierbij werd doelgericht gezocht naar een multitargetremmer voor het BCR-ABL1-eiwit en andere isovormen waar puntmutaties aanwezig zijn in het BCR-ABL1-kinasedomein.

Door de afwezigheid van BCR-ABL1-onafhankelijke resistentiemechanismen bij bosutinib, kan toch resistentie optreden door de aanwezigheid van puntmutaties in het ABL1-kinasedomein. Voor ponatinib is nog geen enkele resistentie gerapporteerd. Een veel voorkomende puntmutatie is p.T315I. Deze mutatie is resistent tegen alle huidige TKI's met uitzondering van ponatinib. Ponatinib is een pan-inhibitor die zowel de native als alle, tot dusver beschreven, mutante BCR-ABL1-eiwitten remt. Het grote probleem met ponatinib is zijn cardiotoxiciteit. Daarom wordt deze behandeling enkel aangeraden wanneer de patiënten geen andere optie meer over hebben [43].

2.3.4.4 Richtlijnen voor gebruik van tyrosinekinase-inhibitoren

Voor de behandeling van elke BCR-ABL1-positieve patiënten worden richtlijnen opgesteld zoals weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3: Overzicht verschillende behandelingen met 5 verschillende TKI's [44]

	Imatinib	Nilotinib	Dasatinib	Bosutinib	Ponatinib
Dosis	1x400 mg	2x300-400 mg	1x 100 mg	1x 500mg	1x 30 mg
Hoe?	Met maaltijd en glas water	2 uur voor en 1 uur na nuchter	/	Met maaltijd	/
Nevenwerkingen	Vochtretentie	Hyperglycemie, pulmonale hypertensie, pericardvocht, cardiaal, vochtretentie, QT-verlenging	Pleuravocht, pulmonale hypertensie, pericardvocht, cardiaal, vochtretentie, QT-verlenging	Pericard vocht, lever, QT-verlenging, vochtretentie	Vochtretentie, levertesten, hypertensie, hypertensie arterieel trombotische gebeurtenissen
Kostprijs per maand	€ 983	€ 2771	€ 3867	€ 3988	€ 6307
Wanneer?	1 ^e lijn	1-2 ^e lijn	1-2 ^e lijn	2 ^e lijn	3 ^e lijn en p.T315I-mutatie

Wanneer patiënten gediagnosticeerd worden met BCR-ABL1-positieve chronische myeloïde leukemie wordt als eerstelijnsbehandeling gebruik gemaakt van drie TKI's: imatinib (eerste generatie), nilotinib en dasatinib (tweede generatie). Imatinib wordt als eerst toegediend omwille van zijn lagere kostprijs ten opzichte van nilotinib en dasatinib. Door de verschillende bijwerkingen van imatinib zijn patiënten soms genoodzaakt om over te schakelen op de overige twee inhibitoren (nilotinib, dasatinib) als eerstelijnsbehandeling. Deze tweede generatie TKI's remmen de BCR-ABL1-tyrosinekinase-activiteit bij veel lagere concentraties dan imatinib, hierdoor worden minder nevenwerkingen verwacht. Er werd nog geen studie uitgevoerd die de tweede generatie (nilotinib en dasatinib) TKI's met elkaar vergelijkt.

Pas wanneer de respons op imatinib onvoldoende is door het ontstaan van resistentie kan overgeschakeld worden naar andere TKI's als tweedelijns-behandeling: nilotinib, dasatinib en bosutinib. Echter, van deze drie remmers is geen enkele actief tegen de meest voorkomende puntmutatie p.T315I. Wanneer de p.T315I-mutatie wordt opgespoord bij een patiënt waar de eerstelijnsbehandeling met imatinib geen bevredigend resultaat opleverde, dan heeft de behandeling met nilotinib, dasatinib of bosutinib nog weinig nut. Sinds kort is voor deze patiënten ponatinib beschikbaar [37].

In Tabel 4 wordt het resistentieprofiel van verschillende TKI's weergegeven voor zeven frequent voorkomende ABL1-kinasedomeinmutaties. Uit deze gegevens blijkt dat veel

puntmutaties aanwezig zijn die zorgen voor therapieresistentie. De kleuren geven de mate van gevoeligheid aan de TKI weer: rood is resistent, oranje is minder gevoelig, geel is licht minder gevoelig en groen is gevoelig.

Tabel 4: Gevoeligheid van TKI's voor mutaties in het ABL1-kinasedomein: rood resistent, oranje minder gevoelig, geel licht minder gevoelig en groen gevoelig [5]

BCR-ABL1	Bosutinib IC50 range (nM)	Imatinib IC50 range (nM)	Dasatinib IC50 range (nM)	Nilotinib IC50 range (nM)	Ponatinib IC50 range (nM)
Ongemuteerd	41.6	260-678	0.8-1.8	<10-25	0.5
p.Q252H	33.7	7343120	3.4-5.6	16-70	2.2
p.Y253H	NB	>6400- 17700	1.3-10	450-1300	6.2
p.E255K	394	3174-12100	5.6-13	118-566	14
p.V299L	1086	540-814	15.8-18	23.7	4
p.T315I	1890	>6400- >20000	137->1000	697->10000	6-11
p.F317L	100.7	810-7500	7.4-18	39.2-91	1.1-4
p.F359V	38.6	1400-1825	2.2-2.7	91-175	4-10

Gezien het verschillende resistentieprofiel van de individuele TKI's is het belangrijk om na te gaan of een puntmutatie aanwezig is in het kinasedomein van ABL1. Aan de hand van deze informatie kan op een rationele manier gekozen worden om de dosis te verhogen of om over te schakelen op een ander TKI.

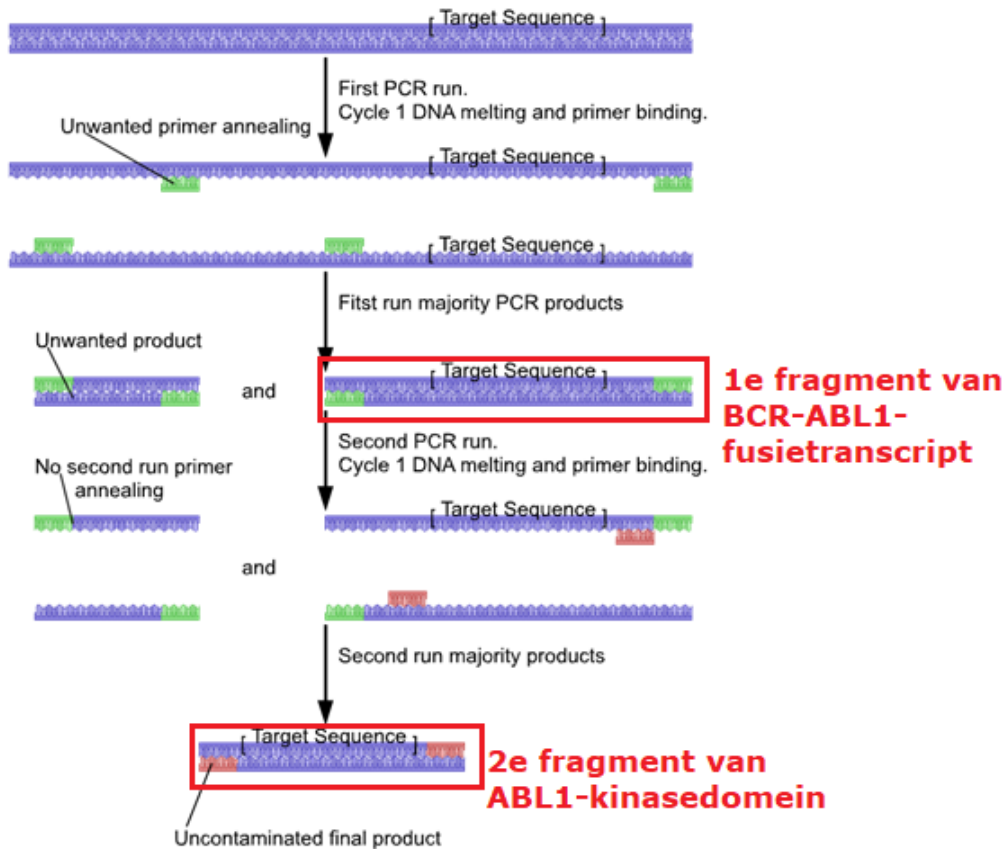
2.3.5 Mutatieanalyse van het ABL1-kinasedomein

Er bestaan verschillende methodes om mutaties in het BCR-ABL1-kinasedomein op te sporen. Veelvuldig gebruikt is een *nested RT-PCR* (nRT-PCR) gevolgd door Sanger sequencing (Figuur 13).

Nested RT-PCR maakt gebruik van twee sets van primers. Door gebruik te maken van twee primersets wordt de specificiteit en sensitiviteit van de PCR-reactie verhoogd [45]. Bij de eerste PCR-amplificatie wordt een fragment aangemaakt, afkomstig van het BCR-ABL1-fusietranscript. Na de eerste PCR-amplificatie volgt een tweede PCR-reactie waarbij gebruik gemaakt wordt van een andere set primers. Bij deze tweede PCR-reactie wordt enkel het ABL1-kinasedomein geamplificeerd.

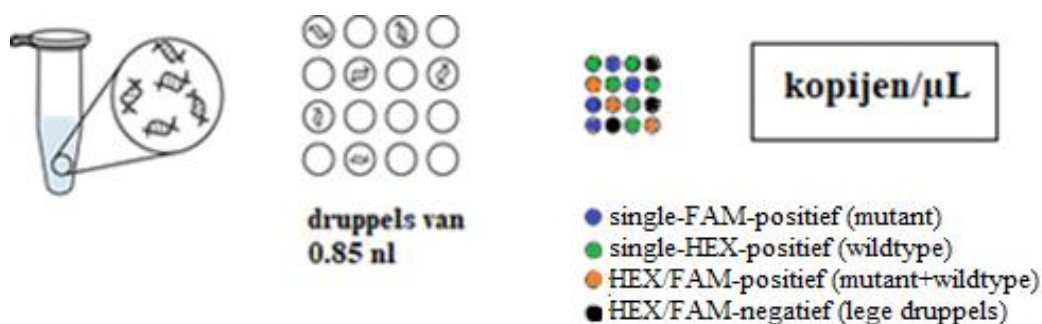
Nadat het fragment van interesse geamplificeerd is, volgt een Sanger sequencing. Dit is een techniek waarbij de opeenvolging van basen achterhaald kan worden (A, T, C, G). Het grootste probleem van nRT-PCR is het gebruikte startmateriaal, zijnde RNA. In de eerste PCR wordt een groot fragment aangemaakt. RNA is echter gevoelig voor afbraak waardoor regelmatig geen PCR-fragment kan worden aangemaakt en het resultaat dus niet te interpreteren is.

Bovendien ligt de detectielimiet van Sanger sequencing slechts tussen de 10-20% waardoor een opkomende resistente kloon gemist kan worden. Om deze reden wordt gezocht naar een alternatieve methode die gevoeliger en robuuster is.



Figuur 13: Principe nRT-PCR: eerste PCR-reactie vormt fragment van BCR-ABL1-fusietranscript en tweede PCR-reactie vormt fragment van ABL1-kinasedomein [46]

Droplet digitale PCR (ddPCR) lijkt een geschikte techniek te zijn voor het opsporen van mutaties in het kinasedomein van ABL1. Deze techniek heeft tal van voordelen waaronder: zeer hoge gevoeligheid, relatief goedkoop, snel en er kan een absolute kwantificatie gebeuren zonder gebruik te maken van een standaardcurve (Figuur 14).



Figuur 14: Principe ddPCR: verdeling staal in druppels, na de ddPCR-reactie meet een detector de graad van fluorescentie o.b.v. de fluorofore probes [7]

Bij ddPCR wordt het te onderzoeken staal samen met de reactiemix bestaande uit: probes, primers, nucleotiden, DNA-polymerase en het restrictie-enzym opgesplitst in duizenden afzonderlijke kleine druppels van 0.85 nanoliter. In elke druppel gebeurt vervolgens een

afzonderlijke PCR-reactie. Tijdens de PCR-reactie wordt gebruik gemaakt van twee competitieve fluorofore probes die binden aan mutant (FAM) of wildtype DNA (HEX). Een twee-kleuren-detector kan een onderscheid maken of een patiënt positief test voor een bepaalde puntmutatie. Nadien vindt een accurate kwantificatie plaats waarbij het aantal kopijen/ μL bepaald kan worden met behulp van een Poisson-verdeling.

Een nadeel van ddPCR, uitgevoerd op DNA, is dat elke patiënt naast het *BCR-ABL1*-fusiegen ook een *ABL1*-wildtype gen heeft dat theoretisch ook puntmutaties kan bevatten (werd nog niet beschreven in de literatuur). Met ddPCR worden alle mutaties aanwezig in het kinasedomein van *ABL1* gescreend zonder een voorafgaande selectie te maken van enkel het *BCR-ABL1*-kinasedomein afkomstig van het fusiegen. Er kan dus geen onderscheid gemaakt worden tussen de mutaties in het normale *ABL1*-gen en deze van het *BCR-ABL1*-fusiegen. Bovendien is ddPCR mutatie-specifiek op het niveau van individuele basen. Andere varianten in hetzelfde codon worden niet gedetecteerd. Hierdoor kunnen vals-negatieve resultaten bekomen worden. Voor elke andere basesubstitutie, hetzij in hetzelfde codon hetzij in een ander codon, moet dus een aparte ddPCR-reactie uitgevoerd worden.

3 Materiaal en methode

3.1 Materiaal

3.1.1 Eerstelijnscontrole

Bij elke mutatieanalyse met ddPCR wordt een eerstelijnscontrole meegenomen. Deze bestaat uit een: negatieve controle, positieve controle (in duplo) en no-template-controle (water). Een eerstelijnscontrole wordt gebruikt om aan te tonen dat de bekomen analyseresultaten correct zijn.

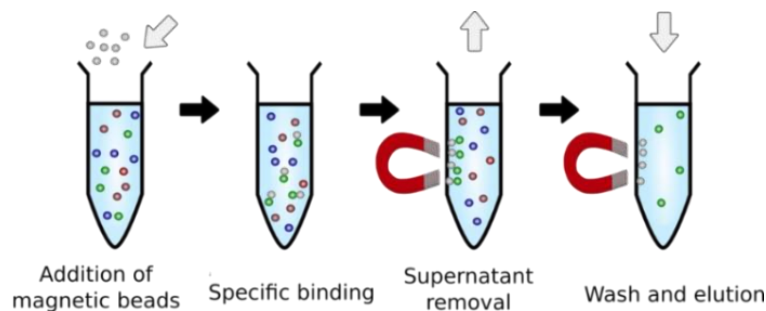
3.1.1.1 Negatieve controle

Als negatieve controle wordt momenteel de DLD-1-celijn gebruikt, afkomstig van een colorectaal adenocarcinoma. Het voordeel van cellijnen is hun onuitputtelijke bron. De DLD-1-celijn bevat geen puntmutatie in het ABL1-kinasedomein en wordt in elke mutatieanalyse meegenomen als negatieve controle om de juistheid van de ddPCR-mutatieanalyse na te gaan.

3.1.1.2 Positieve controle

De huidige positieve controles zijn afkomstig van positieve patiëntenstalen. Omdat geen cellijnen beschikbaar zijn voor de ABL1-puntmutaties worden patiëntenstalen gebruikt. Om het patiëntenstaal als positieve controle te gebruiken, wordt dit verdund in de negatieve DLD-1-controle tot een fractional abundance (FA) van 0.5% wordt bereikt. Deze FA-waarde stemt overeen met vijf mutante kopijen/ μL . De FA wordt uitgedrukt in een percentage waarbij de verhouding tussen het aantal mutante kopijen/ μL ten opzichte van het totale aantal mutante en wildtype kopijen/ μL wordt bepaald.

Het patiënten-DNA wordt geëxtraheerd uit een bloed- of beenmergstaal. Deze semi-automatische extractie gebeurt met de Chemagic DNA blood kit op het Chemagen toestel zoals weergegeven in Figuur 15.



Figuur 15: Principe DNA-extractie met magnetische beads [47]

Het bloedstaal wordt eerst geïncubeerd met een lysisbuffer die zorgt voor het vrijkomen van de celinhoud. Vervolgens worden magnetische beads toegevoegd, deze beads gaan specifiek

binden met het DNA. Door een magnetisch veld aan te leggen, kunnen de DNA-fragmenten, gebonden aan de beads, opgezuiverd worden door het uitvoeren van een aantal wasstappen. Als laatst wordt het DNA-staal geëluëerd van de beads [47].

Omdat het patiëntmateriaal eindig is, worden de positieve controles vervangen door een onuitputtelijke voorraad aan materiaal: gBlocks. Deze dubbelstrengige en sequentiegeverifieerde gBlocks van 450 basenparen lang, worden aangekocht bij *Integrated DNA Technologies* (IDT). De gBlocks bevatten enkel mutant DNA. Om een representatieve positieve controle te verkrijgen moeten de gBlocks verdund en gemengd worden met wildtype DNA (DLD-1). Omdat een FA van 0.5% (conform met de huidige PC's) het liefst wordt aangehouden, moeten de gBlocks hiernaar verdund worden.

In totaal worden zeven gBlocks besteld: zes voor de reeds gebruikte ABL1-mutatiessays en één voor de te valideren p.V299L-assay. Elke gBlock wordt geleverd aan 500 ng gelyofiliseerd mutant materiaal. Eerst wordt een seriële verdunningsreeks aangemaakt in TE-buffer met een pH-waarde van 8.5. Deze pH-waarde van 8.5 doet dienst als stabilisator voor het zeer laag geconcentreerde DNA. Voor de bereiding van de verschillende condities als positieve controles, waarbij gestreefd wordt naar een FA van 0.5%, wordt verdund in de DLD-1-cel lijn.

De eigenschappen van de zeven geleverde gBlocks worden weergegeven in de Bijlage A.

3.1.2 ddPCR

In Tabel 5 wordt een overzicht weergegeven van de reagentia en hun hoeveelheden die nodig zijn voor de ddPCR-reactie.

Tabel 5: Hoeveelheden reagentia voor ddPCR-analyse

Reagentia	#/reactie
Patiënten-DNA	1 μ L (met een concentratie van 100 ng/ μ L)
Restrictie-enzym (10 U/ μ L) ¹	0.2 μ L restrictie-enzym MseI 0.8 μ L CutSmart buffer
Reactiemix (21 μ L/reactie)	11 μ L ddPCR Supermix for Probes 1 μ L 20x mutant/wildtype probe/primer 1 μ L MseI restrictie-enzym (2 U/ μ L) 8 μ L nuclease vrij water

Een ddPCR-analyse vereist een totaal volume van 22 μ L waaronder: 21 μ L reactiemix en 1 μ L DNA-staal afkomstig van de patiënt.

Het restrictie-enzym wordt geleverd door New England BioLabs (NEB), het nuclease vrij water door Ambion en de overige reagentia in de reactiemix worden geleverd door Bio-Rad.

¹ Restrictie-enzym wordt verdund naar 2 U/ μ L

De gebruikte materialen voor de ddPCR-ABL1-mutatieanalyse worden weergegeven in Figuur 16 [7]. De multichannel pipet (C) wordt geleverd door Rainin, de overige toestellen (A, B, D, E, F) door Bio-Rad.



A



B



C



D



E



F

Figuur 16: Gebruikte materialen voor ddPCR-mutatieanalyse: A) QX200 Droplet Generator, B) ddCPR-96-wellplaat, C) Elektrische multichannel pipet RAININ E4 XLS, D) PX1 PCR Plate Sealer, E) C1000 Touch™ Thermal Cycler T-87316 en F) QX200 Droplet Reader

3.2 Methode

3.2.1 ddPCR-mutatieanalyse

In het moleculair diagnostische labo van UZ Leuven wordt droplet digitale PCR routinematig gebruikt voor het opsporen van ABL1-puntmutaties. Dit in kader van therapieresistente BCR-ABL1-positieve leukemie.

3.2.1.1 Principe

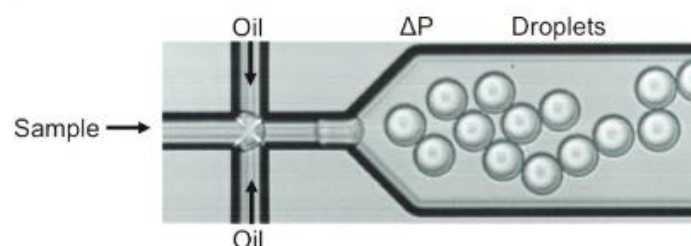
Binnen de ddPCR-analyse wordt gebruik gemaakt van een endonuclease, MseI, als restrictie-enzym zoals weergegeven in Figuur 17.



Figuur 17: Endonuclease MseI [48]

Dit restrictie-enzym zorgt ervoor dat de DNA-template gefragmenteerd wordt in kortere stukken. Het restrictie-enzym heeft een herkenningsplaats van vier basenparen lang [48]. Voor de keuze van het restrictie-enzym moet rekening worden gehouden met een aantal belangrijke factoren. Enerzijds mag het enzym niet knippen in het PCR-target zelf. Anderzijds mag het enzym niet gevoelig zijn voor methylatie zodat incomplete fragmentatie vermeden wordt [49].

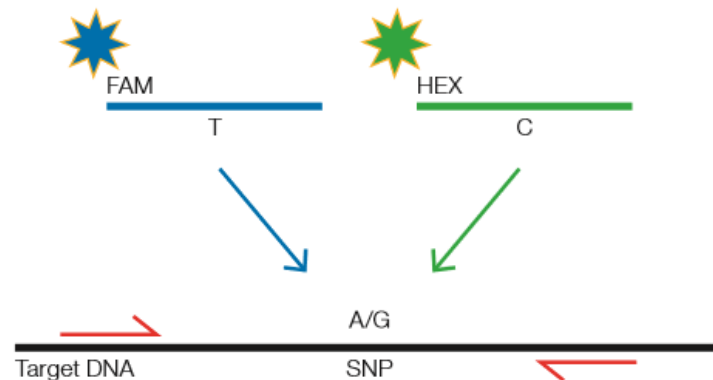
Voorafgaand aan de PCR-reactie wordt het staal (reactiemix en gefragmenteerd DNA) verdeeld over duizenden kleine druppels van 0.85 nanoliter met in elke druppel één of meerdere DNA-fragmenten. De druppels worden gegenereerd door een *Droplet Generator* zoals weergegeven in Figuur 18.



Figuur 18: Generatie van druppels met Droplet Generator voor de ddPCR-reactie [50]

Voor de generatie van druppels wordt gebruik gemaakt van de kennis over microfluidum en surfactant chemie. Tijdens de druppelgeneratie wordt twintig microliter van het staal geïnjecteerd in de hiervoor voorziene wellen. Druppel-generatie-olie wordt in de andere wellen gepipetteerd en bevat een stabiliserend surfactant. Nadien wordt een vacuüm aangelegd. Hierdoor komen het staal en de olie terecht in een flowjunctie waar de monodisperse druppels gegenereerd worden aan duizenden druppels per seconde. Deze druppels komen nadien terecht in een *droplet-well* waar deze zich snel concentreren door een dichtheidsverschil tussen de olie en de vloeibare fase [50].

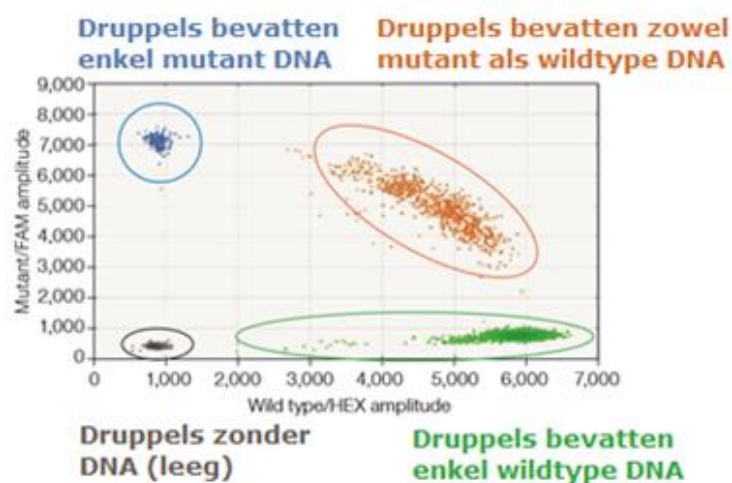
Nadat de druppels gegenereerd zijn, wordt in elke afzonderlijke druppel een PCR-reactie uitgevoerd. In eerste instantie worden de DNA-fragmenten gedeneureerd tot enkelstrengig-DNA (ssDNA) bij een temperatuur van 94°C. Nadien volgt een annealingstap waarbij de probes en de primers gaan hybridiseren met het ssDNA. Bij de ddPCR-reactie wordt gebruik gemaakt van een forward/reverse primer (primerpaar) en twee competitieve fluorofore probes zoals weergegeven in Figuur 19.



Figuur 19: Annealing van twee fluorofore probes: FAM-probe (blauw) bindt aan mutant DNA, HEX-probe (groen) bindt aan wildtype DNA [7]

De probe die bindt aan het mutante DNA is FAM-gelabeled (blauw), de probe die bindt aan het wildtype DNA is HEX-gelabeled (groen). Vervolgens volgt een extensiestap bij een temperatuur van 55°C waarbij het DNA-polymerase de complementaire streng aanmaakt door het aanvoeren van nucleotiden. Er worden veertig cycli doorlopen. Tot slot wordt het DNA-polymerase geïnactiveerd bij 98°C [7].

Na de ddPCR-reactie wordt het staal in een Droplet Reader geplaatst. Dit toestel zuigt de druppels een voor een op, waarna ze langs een twee-kleuren-detector geleid worden. Voor de interpretatie van de bekomen data wordt gebruik gemaakt van de QuantaSoft™-software zoals weergegeven in Figuur 20 (zie verder bij §3.2.1.3).



Figuur 20: Voorstelling 2D-plot verkregen door QuantaSoft-software: blauwe druppels met enkel mutant materiaal (single-FAM-positief), groene druppels met enkel wildtype materiaal (single-HEX-positief), oranje druppels met zowel wildtype als mutant materiaal (HEX/FAM-positief) en zwarte druppels zijn leeg (FAM/HEX-negatief) [7]

Afhankelijk van de kleur die de detector waarneemt, kan een onderscheid gemaakt worden of de druppel enkel wildtype DNA (single-HEX, groen), enkel mutant DNA (single-FAM, blauw), een mix van beiden (FAM/HEX, oranje) of geen DNA (zwart) bevat. De software geeft het aantal positieve, negatieve en lege druppels weer voor elk fluorofoor in een 2D-plot. Nadien wordt de fractie aan positieve druppels (mutant of wildtype DNA) onderworpen aan een Poisson-algoritme zoals weergegeven in vergelijking (1) [51]. Hieruit kan het absoluut aantal kopijen per microliter bepaald worden.

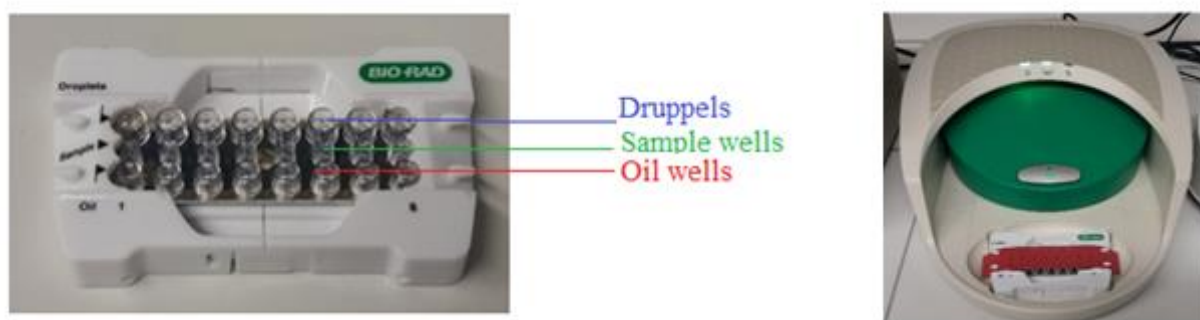
$$\text{aantal kopijen mutant DNA per } \mu\text{L} = -\ln\left(1 - \frac{\text{positieve druppels}}{\text{totaal aantal druppels}}\right) \quad (1)$$

3.2.1.2 Werkwijze

De voorbereidende stap omvat de verdunning van een patiëntenstaal in nuclease vrij water tot 100 ng/ μL . Voor elke ABL1-mutatieanalyse wordt een eerstelijnscontrole meegenomen (zie §3.1.1).

Er wordt 21 μL van de reactiemix in een epje overgebracht (zie Tabel 5). Aan elk epje wordt vervolgens 1 μL patiënten-DNA van 100 ng/ μL toegevoegd. Nadien volgt een incubatie op kamertemperatuur gedurende 20 minuten zodat de restrictie-digestie met MseI kan plaatsvinden.

Vervolgens wordt een cartridge in een cartridgehouder geplaatst en wordt 20 μL van elk epje in de “sample well” gepipetteerd. Daarna wordt 70 μL *Droplet Generation oil for probes* in de “oil wells” van de cartridge gebracht (Figuur 21, A). Hierna wordt de cartridge in de Droplet Generator geplaatst (Figuur 21, B) waar de druppels gegenereerd worden.



Figuur 21: A) Droplet Cartridge

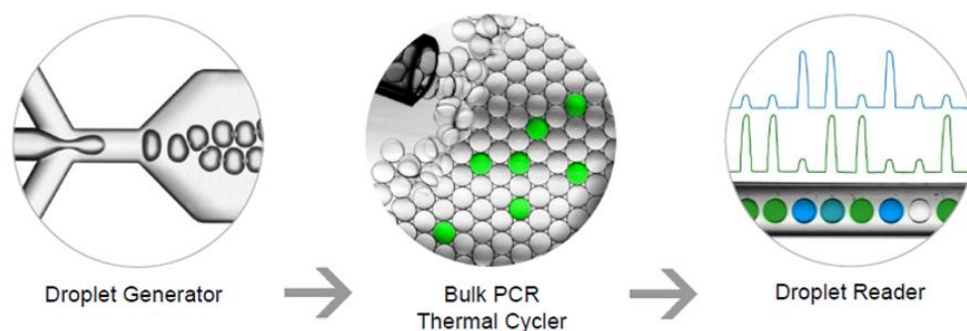
B) Droplet Generator

De aangemaakte druppels worden vervolgens naar een ddPCR-96-wellplaat overgebracht met de elektrische multichannelpipet (40 μL met een uitloopsnelheid van 1). Nadien wordt de 96-wellplaat geseald om verdamping van het staal tegen te gaan. Tot slot volgt de PCR-amplificatie in een C1000 TouchTM Thermal Cycler T-87316. Het gevolgde temperatuurprogramma wordt weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6: Gebruikt ddPCR-programma

	Temperatuur	Tijd	Aantal cycli
Activatie enzym	95°C	10 min	1
Denaturatie DNA-streng	94°C	40 sec	40
Annealing/extensie	55°C	1 min	40
Deactivatie enzym	98°C	10 min	1
Hold	12°C	-	1

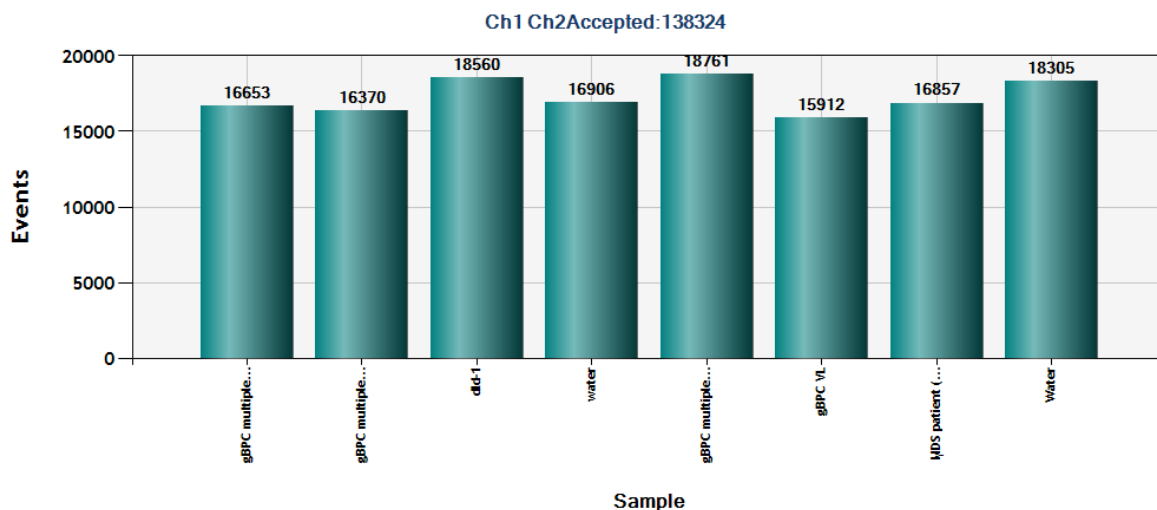
Na de ddPCR-reactie wordt de ddPCR-96-wellplaat in een Droplet Reader geplaatst om de fluorescentiegraad van elke druppel te meten. In Figuur 22 wordt een samenvatting weergegeven van het ddPCR-werkingsmechanisme.



Figuur 22: ddPCR-methode: druppelgeneratie, ddPCR-reactie en druppels aflezen [7]

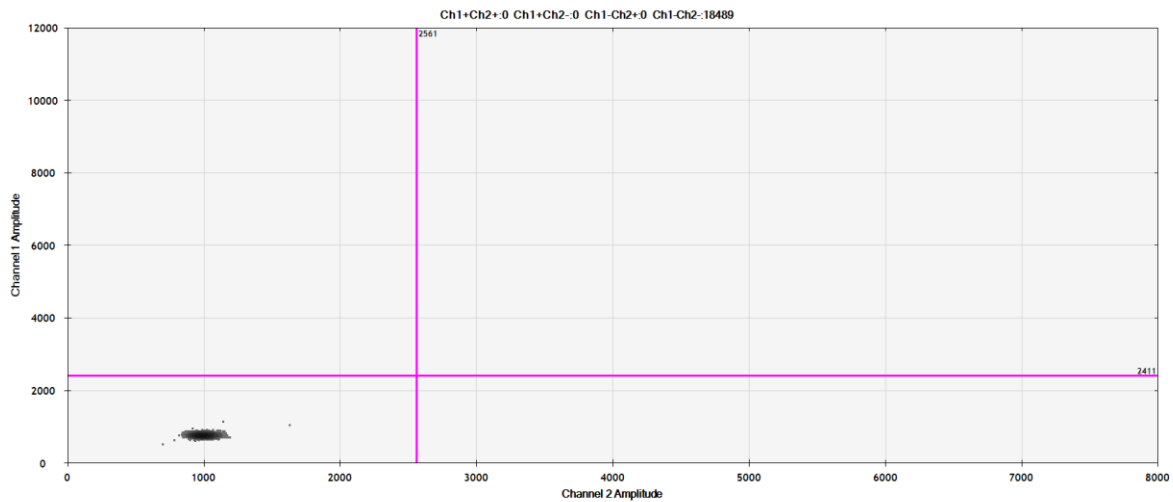
3.2.1.3 Interpretatie van de data

Na elke ddPCR-analyse moeten verschillende parameters gecontroleerd worden vooraleer de test aanvaard wordt zoals weergegeven in Figuur 23, Figuur 24, Figuur 25 en Figuur 26. Dit is noodzakelijk om tot een juiste interpretatie van de data te komen. Indien niet voldaan is aan deze voorwaarden moet beslist worden of deze test herhaald moet worden of dat het resultaat geïnterpreteerd mag worden met aangepaste criteria.



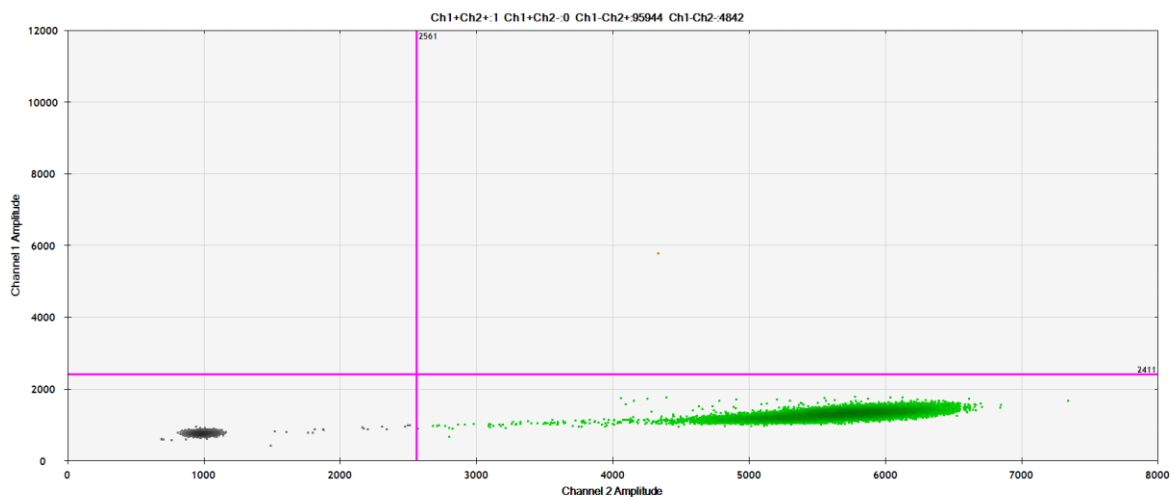
Figuur 23: Voorbeeld van het totale aantal gegenereerde druppels > 10000

Ten eerste moet het totale aantal druppels, die per well gegenereerd worden, groter zijn dan 10000 (Figuur 23). Nadat het totale aantal druppels gecontroleerd werd, kunnen de juiste thresholds ingesteld worden bij elk ABL1-assay. Deze thresholds worden bepaald en vastgelegd tijdens de validatie. De threshold van Channel 1 (y-as) is de grens waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen FAM-positief en FAM-negatief, dit wordt weergegeven door een horizontale lijn. De threshold van Channel 2 (x-as) is de grens waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen HEX-positief en HEX-negatief, dit wordt weergegeven door een verticale lijn.



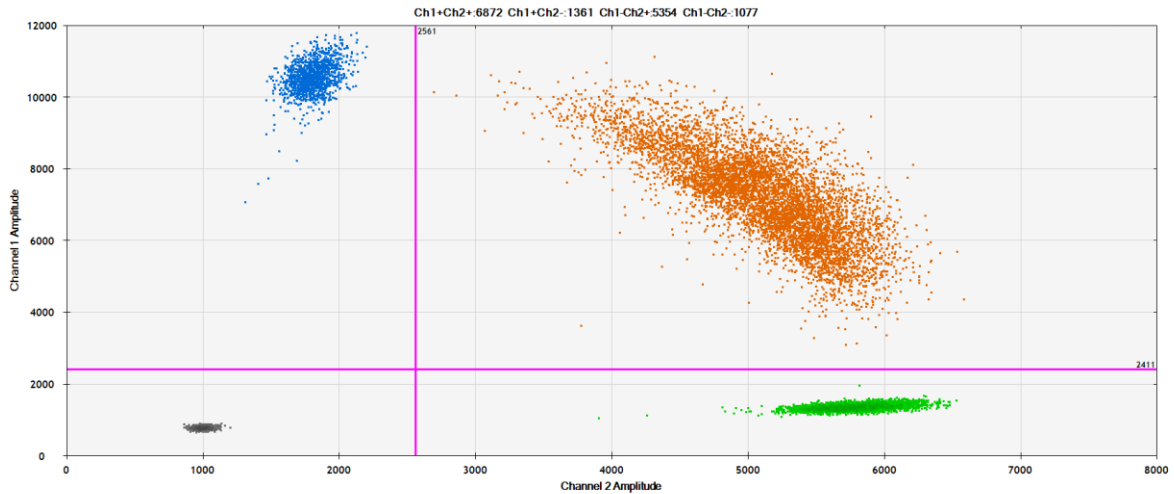
Figuur 24: No-template-controle zonder FAM (Ch1)- en HEX (Ch2)-positieve druppels

Ten tweede mag water geen FAM- en HEX-positieve druppels bevatten (Figuur 24). Bij water mag enkel een zwarte wolk waarneembaar zijn. Deze zwart wolk bevat geen mutant en wildtype DNA.



Figuur 25: DLD-1 zonder FAM (Ch1)-positieve druppels

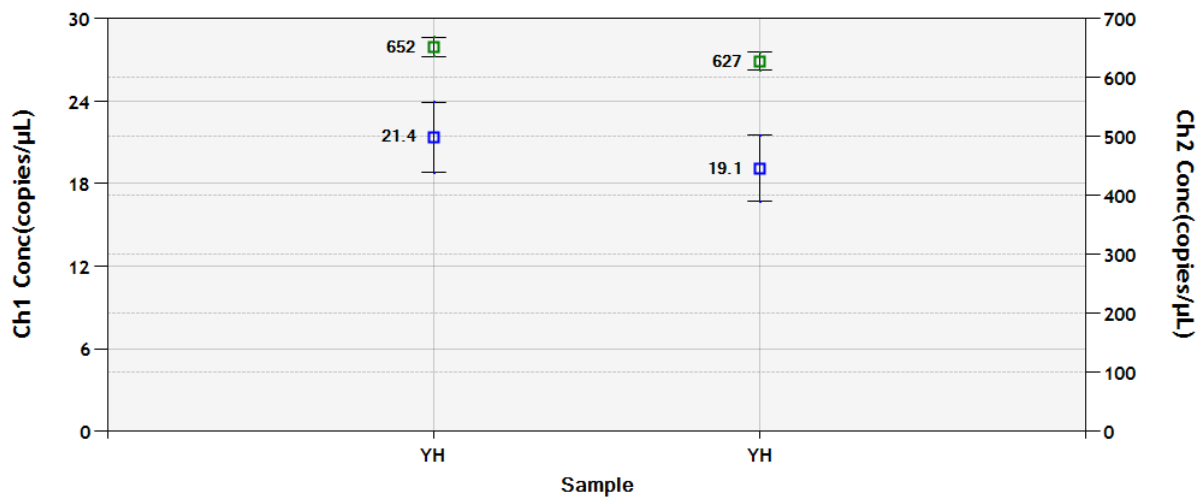
Ten derde mogen bij DLD-1 geen FAM-positieve druppels aanwezig zijn aangezien DLD-1 wildtype materiaal is (Figuur 25).



Figuur 26: Positieve controle met HEX- en FAM-positieve druppels (Ch1 en Ch2)

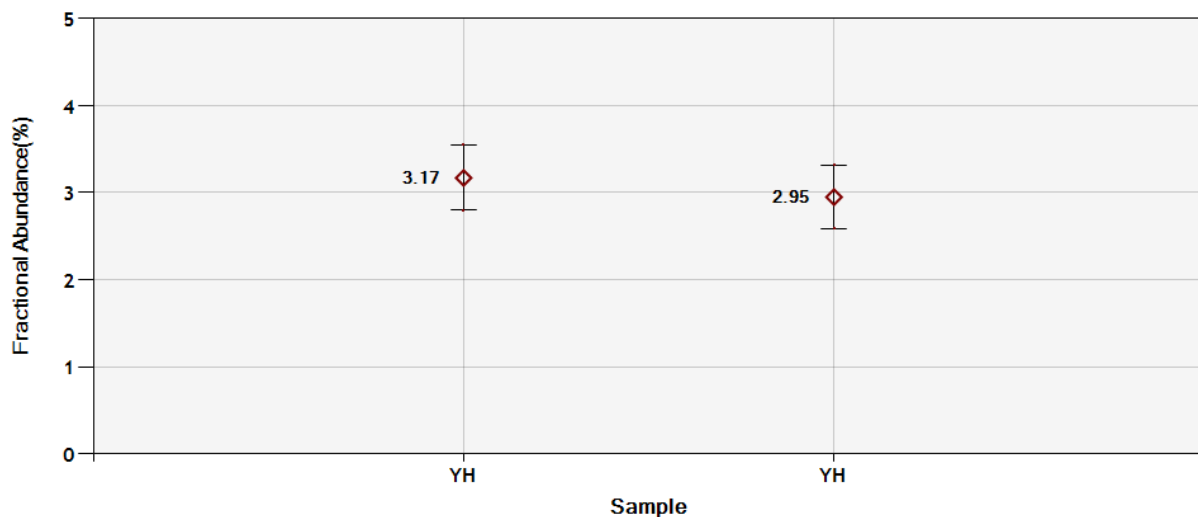
Tot slot moet de 0.5% positieve controle FAM- en HEX-positieve druppels bevatten (Figuur 26). De waarde van de PC moeten bovendien binnen de vastgelegde thresholds liggen.

Nadat de ddPCR-analyse aanvaard wordt, kan een verdere interpretatie gebeuren van de verkregen data zoals weergegeven in Figuur 27 en Figuur 28.



Figuur 27: Concentratiegrafiek geeft het aantal kopijen /μL weer van mutant (Ch1) DNA en wildtype (Ch2) DNA

Uit een concentratiegrafiek wordt het aantal mutante en wildtype kopijen/μL per staal weergegeven, dit wordt bepaald met de Poisson-verdeling (zie §3.2.1.1).



Figuur 28: Fractional abundance: percentage mutant materiaal t.o.v. mutant en wildtype materiaal

Bovendien wordt ook de fractional abundance (FA) berekend en weergegeven voor elk staal. De FA geeft het percentage mutante kopijen/ μL ten opzichte van het totale aantal kopijen/ μL weer zoals weergegeven in vergelijking (2).

$$FA = \frac{\text{aantal mut kopijen}/\mu\text{L}}{\text{aantal mut kopijen}/\mu\text{L} + \text{aantal WT kopijen}/\mu\text{L}} * 100 \quad (2)$$

3.2.2 Optimalisatie p.V299L-assay

Het voornaamste doel van deze optimalisatie is om na te gaan of de huidige ddPCR-analysemethode, voor het opsporen van puntmutaties in het ABL1-kinasedomein, ook geschikt is voor het opsporen van de p.V299L-puntmutatie. Tijdens de optimalisatie wordt gebruik gemaakt van een patiëntenstaal (initialen patiënt: SR), positief voor de p.V299L-mutatie.

In een eerste test (zie §4.1.1) werd het *custom designed* p.V299L-assay uitgetest volgens het huidige ddPCR-protocol (zie Bijlage B). Dit huidige protocol wordt gebruikt voor het opsporen van de overige zes ABL1-puntmutaties. Het resultaat toont aan dat een slechte clusterscheiding aanwezig is, dit bemoeilijkt de verdere interpretatie van de resultaten.

Idealiter vertoont een goede clusterscheiding vier afzonderlijke clusters met druppels binnen de opgelegde thresholds:

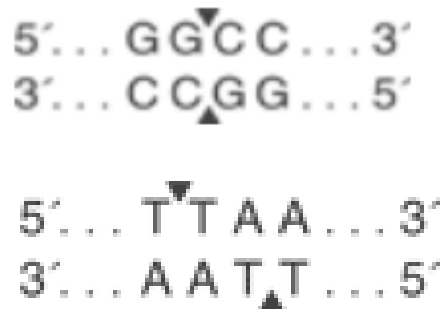
- FAM-positief, HEX-negatief (single-FAM-positief, blauwe cluster);
- HEX-positief, FAM-negatief (single-HEX-positief, groene cluster);
- HEX/FAM-positief (dubbel positief, oranje cluster);
- HEX/FAM-negatief (dubbel negatief, zwarte cluster).

Mogelijke oorzaken van een slechte clusterscheiding zijn: kwaliteit van het DNA-staal (contaminanten), geen optimale annealingtemperatuur of gebruik van een verkeerd restrictie-

enzym dat knipt in het target-DNA. Aangezien de mutatieanalyse geen bruikbaar resultaat oplevert, wordt geprobeerd om een van de voorgenoemde parameters te veranderen.

Eenzijds kan de kwaliteit van het staal verbeterd worden door de DNA-input te verlagen. Hierdoor worden eventuele contaminanten ook verdund waardoor deze mogelijk geen invloed meer uitoefenen op de ddPCR-reactie.

Anderzijds kan een slechte clusterscheiding ook veroorzaakt worden wanneer het gebruikte restrictie-enzym knipt in het target-DNA (Figuur 29).



Figuur 29: Knipplaatsen restrictie-enzymen HaeIII (boven) en MseI (onder)

Voor de ABL1-mutatieanalyse wordt in de huidige routinecontroles gebruik gemaakt van MseI als restrictie-enzym. MseI heeft *sticky-ends*. Door MseI te vervangen door HaeIII (*blunt-ends*) kan de invloed van het gebruikte restrictie-enzym bepaald worden.

Tot slot kan de annealingtemperatuur worden aangepast. Om een optimale annealingtemperatuur te bepalen, wordt gewerkt met een temperatuurgradiënt (zie Figuur 30).



Figuur 30: Optimalisatie clusterscheiding door gebruik van een temperatuurgradiënt voor de annealingtemperatuur: door een verlaging van de annealingtemperatuur kan de opbrengst aan PCR-product groter worden (Ch2 Amplitude stijgt) [7]

De annealingtemperatuur is één van de meest kritische parameters voor de reactiespecificiteit. Wanneer de annealingtemperatuur wordt verlaagd, kunnen primers gemakkelijker binden. Hierdoor is de kans groter dat ze op willekeurige plaatsen binden wat een aspecifieke PCR-reactie tot gevolg heeft. Als de annealingtemperatuur verhoogd wordt, kunnen de primers

moeilijker binden waardoor de PCR-reactie een verhoogde specificiteit verkrijgt. Echter, wanneer te hoge temperaturen gebruikt worden, kan dit de opbrengst aan gewenst PCR-product verlagen omdat hoge temperaturen ervoor zorgen dat waterstofbrugkrachten tussen de primer/probe en de DNA-template gebroken worden. Daarom wordt een temperatuurbereik gekozen waarbij de temperatuur zowel boven als onder de standaard-annealingtemperatuur (gebruikt door Bio-Rad voor ddPCR-assays) van de primers/probes is gelegen. Vervolgens wordt het temperatuurs-interval vernaauwd om zo uiteindelijk tot de meest optimale annealingtemperatuur te komen.

Aangezien de terugbetalingsvoorwaarde van bosutinib de afwezigheid van zowel de p.V299L-mutatie als de p.T315I-mutatie omvat, worden beide ABL1-assays idealiter samen uitgevoerd. Nadat een optimale annealingtemperatuur gevonden wordt voor de p.V299L-assay, wordt gecontroleerd of dezelfde annealingtemperatuur voor de p.T315I-assay toegepast kan worden.

3.2.3 Verificatie overige ABL1-assays

De zes reeds gevalideerde ABL1-assays (p.Q252H, p.Y253H, p.E255K, p.T315I, p.F317L en p.F359V) hebben een identiek protocol waardoor deze ddPCR's gelijktijdig kunnen uitgevoerd worden. Er vindt een verificatie plaats van de overige zes ABL1-assays waarbij de vastgelegde parameters na de optimalisatie van de p.V299L-assay nagegaan worden (zie §3.2.2).

Tijdens de verificatie wordt nagegaan wat de impact is van de gewijzigde parameters op de clusterscheiding (false positive rate), de gevalideerde thresholds en de detectielimiet. Deze overige ABL1-assays werden al gevalideerd bij een annealingtemperatuur van 55°C. Bij deze temperatuur werden tijdens de validatie thresholds vastgelegd zoals weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7: Reeds gevalideerde thresholds ABL1-assays bij 55°C

Puntmutatie	Threshold (FAM-HEX)
p.Q252H	1545-1626
p.Y253H	1060-1550
p.E255K	2170-1500
p.T315I	4013-2300
p.F317L	1859-1856
p.F359V	2750-2800

3.2.4 Validatie p.V299L-assay

Tijdens een validatie wordt objectief aangetoond of een analysemethode geschikt is voor de beoogde toepassing en dus aan de nodige vereisten voldoet die gesteld worden. In deze thesis wordt de p.V299L-assay gevalideerd met droplet digitale PCR. Er bestaan vijf types van testen. Afhankelijk van het type moeten verschillende prestatiekenmerken onderzocht worden.

Bijlage C geeft een overzicht van de prestatiekenmerken die gecontroleerd en gevalideerd moeten worden bij het implementeren van de nieuwe ABL1-p.V299L-assay [52]. Aangezien het hier gaat over een kwantitatieve test, moeten de volgende parameters nagegaan worden: juistheid, reproduceerbaarheid, robuustheid en de detectielimiet.

3.2.4.1 Juistheid

De juistheid geeft aan hoe dicht het resultaat gelegen is bij een bepaalde referentiewaarde. Dit wordt gedefinieerd als de mogelijkheid van een test om het genotype correct te kunnen bepalen. Idealiter wordt gebruik gemaakt van derdelijnscontrolestalen. Hierbij moet het bekomen ddPCR-resultaat overeenkomen met het resultaat verkregen van de derdelijnsstudie. Onder een derdelijnscontrole wordt de deelname aan een extern georganiseerde test bedoeld. Er worden jaarlijks verschillende externe kwaliteitscontroles georganiseerd. Deze controle bestaat eruit dat een organiserende instelling identieke monsters opstuurt naar een groep van deelnemende laboratoria. Na de analyse en rapportage door alle laboratoria stelt de organisator een rapport op waaruit de deelnemende laboratoria kunnen afleiden hoe de eigen resultaten zich verhouden tot die van andere deelnemers [53]. Voor de derdelijnscontrole worden vier negatieve *External Quality Assessment* (EQA)-stalen voor de p.V299L-puntmutatie hertest die in 2017 en 2018 ontvangen werden: KDM 124, KDM 125, KDM 126 en KDM 127.

Daarnaast wordt de juistheid van een nieuwe test geëvalueerd aan de hand van gekende positieve en negatieve patiëntenstalen. Tot voor kort werd de ABL1-mutatieanalyse uitgevoerd op cDNA. Vaak beschikt CME niet over DNA van eenzelfde datum. Daarom worden verschillende DNA-stalen van een gekende ABL1-p.V299L-positieve patiënt, rond de datum van het positieve resultaat, getest. Dit moet toelaten om één of meerdere p.V299L-positieve DNA-stalen te vinden. De geteste verwachte negatieve stalen worden ook gebruikt voor het bepalen van de false positive rate (FPR). De FPR is een maat voor het aantal positieve FAM-druppels in een negatief staal. Deze druppels worden beschouwd als vals-positief en moeten in rekening worden gebracht bij het bepalen van de detectielimiet.

3.2.4.2 Reproduceerbaarheid

Onder reproduceerbaarheid wordt de mate van spreiding in de meetresultaten verstaan. Dit wordt bepaald door de methode een aantal keren, onder vastgelegde condities, op hetzelfde staal uit te voeren. Deze mate van spreiding wordt uitgedrukt als een standaarddeviatie van de herhaalde resultaten of een betrouwbaarheidsinterval rond het gemiddelde resultaat. Het is een kengrootheid die de spreiding weergeeft die verwacht kan worden wanneer hetzelfde staal routinematig geanalyseerd wordt. Hierbij moet een vergelijkbaar resultaat verkregen worden bij de beschreven procedure. De standaarddeviatie wordt berekend met behulp van de onderstaande vergelijking (3):

$$s_{RW} = \sqrt{\left(\frac{1}{n-1}\right) * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3)$$

Waar:

n = aantal metingen

x_i = bekomen waarde

\bar{x} = gemiddeld bekomen waarde

Er wordt verder nog een onderscheid gemaakt tussen de intra-run- en de inter-runvariatie. Bij de intra-runvariatie wordt een staal in duplo getest in dezelfde run. Het resultaat mag niet significant afwijken. Bij de inter-runvariatie mag het resultaat voor een staal niet significant afwijken wanneer dit meegenomen wordt in een andere run. De intra-run- en inter-runvariatie worden bepaald aan de hand van twee positieve patiëntenstalen [53].

3.2.4.3 Robuustheid

De robuustheid is de mate van ongevoeligheid voor variaties in bepaalde omstandigheden zoals: staalsoort, DNA-concentratie, extractiemethode en uitvoerder [53].

Om de robuustheid van het p.V299L-assay na te gaan wordt gebruik gemaakt van DNA afkomstig van bloed- en beenmergstalen. De invloed van de DNA-input wordt getest aan de hand van een ABL1-p.V299L-positieve patiënt waarbij een input van 10 ng/μL en 100 ng/μL wordt vergeleken. Daarnaast wordt gekeken welke methoden gebruikt werden voor DNA-extractie en of dit een invloed heeft op de hieruit verkregen resultaten. Hierbij worden DNA-stalen gekozen die geëxtraheerd werden door een Chemagetoestel of een QiaAmp-DNA-mini-kit-toestel. Tot slot wordt de robuustheid nagegaan wanneer de ddPCR-analyse door twee verschillende personen wordt uitgevoerd.

3.2.4.4 Detectielimietcontrole

Onder de detectielimietcontrole (*limit of detection* (LOD)) worden de uiterste waarden verstaan die een betrouwbaar en detecteerbaar resultaat kunnen opleveren. Het is de laagste concentratie aan analyt die nog betrouwbaar gedetecteerd kan worden boven de achtergrondruis [53].

Voor de andere ABL1-mutatieassays werd tijdens de validatie de aantoonbaarheidsgrens vastgelegd op een FA van 0.5%. Dezelfde detectielimiet wordt beoogd voor de p.V299L-assay. Voor het bepalen van de detectielimiet wordt de positieve p.V299L-gBlock-controle gebruikt met een FA van ongeveer 0.5% (zie verder §3.2.5).

3.2.5 Verdunning van de gBlocks

De gBlocks worden geïmplementeerd als positieve controle voor de verschillende ABL1-assays. Deze moeten de positieve patiëntenstalen vervangen die momenteel als positieve controle gebruikt worden.

De gBlocks worden geleverd aan 500 ng gelyofiliseerd mutant materiaal. Voor het resuspenden wordt het protocol gevolgd dat door IDT wordt voorgeschreven. De tubes worden drie tot vijf seconden gecentrifugeerd en de pellet wordt gesuspenderd in 50 µL TE-buffer met een pH van 8.5. Vervolgens worden de tubes geïncubeerd voor twintig minuten aan een temperatuur van 50°C in een warmwaterbad zodat de volledige pellet oplost. De tubes worden kort gevortexed en gecentrifugeerd. De finale concentratie is 10 ng/µl mutant DNA. Voor elke gBlock wordt het aantal kopijen/µL berekend aan de hand van onderstaande vergelijking (4) [6].

$$\frac{C * \text{Getal van Avogadro}}{M * 10^9 \text{ng/g}} = \text{aantal kopijen}/\mu\text{L} \quad (4)$$

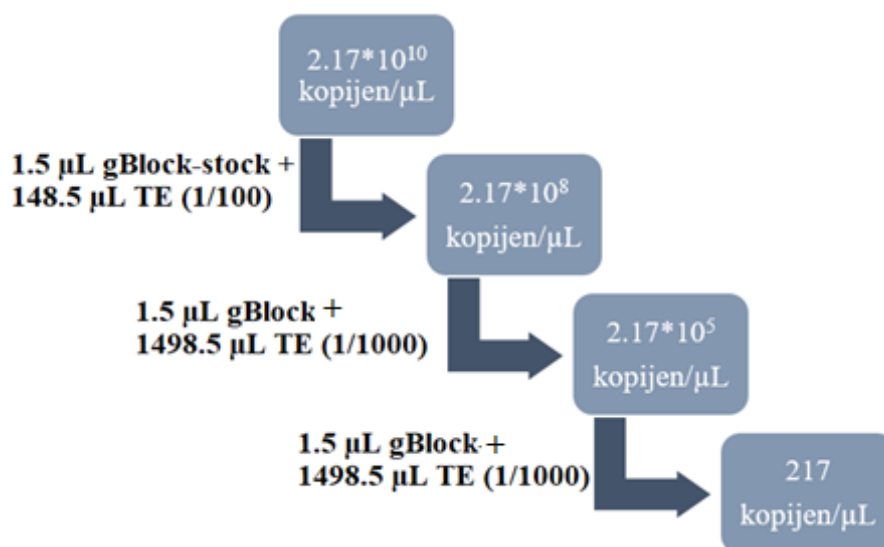
Waar:

C = eigenlijke concentratie van de gBlock in ng/µL (10 ng/µL)

M = moleculair gewicht gBlock in g/mol (zie Bijlage A)

$\text{Getal van Avogadro}$ = $6.022 * 10^{23}$ moleculen/mol

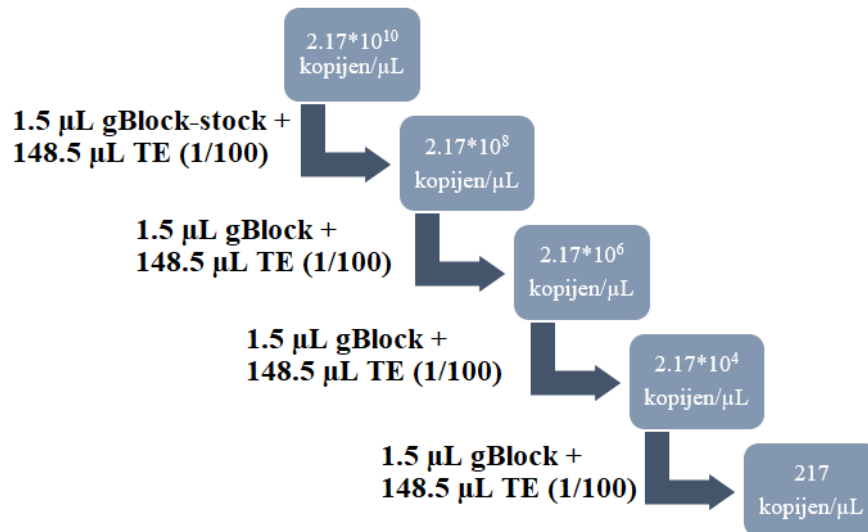
Vervolgens wordt serieel verdund in TE-buffer (pH 8.5) tot een lager aantal mutante kopijen/µL bekomen wordt. De seriële verdunningsreeks wordt weergegeven in Figuur 31.



Figuur 31: Voorstelling seriële verdunningsreeks voor p.F359V-gBlock

Eerst wordt honderd keer verdund tot $2.17 * 10^8$ mutante kopijen/µL. Nadien volgen twee stappen waarbij telkens duizend keer verdund wordt totdat uiteindelijk 217 mutante kopijen/µL aanwezig zijn.

Doordat niet-significante verdunningsfouten duizendvoudig uitvergroot worden (zie verder bij §4.2.1), wordt de seriële verdunningsreeks aangepast zoals weergegeven in Figuur 32.



Figuur 32: Aanpassing seriële verdunningsreeks om verdunningsfouten te beperken

Hierbij wordt vier keer honderd keer verdund totdat opnieuw een verdunning bekomen wordt met 217 mutante kopijen/ μ L (Figuur 32).

De huidige positieve patiëntencontroles worden verdund in een wildtype cellijn (DLD-1). Ze hebben een FA van ongeveer 0.5%, dit stemt overeen met ongeveer vijf mutante kopijen/ μ L. Vertrekkende van de aangemaakte 217 mutante kopijen/ μ L, in de verdunningsreeks, worden verschillende condities aangemaakt in DLD-1 en TE-buffer (pH 8.5) die theoretisch een resultaat vijf mutante kopijen/ μ L oplevert.

Tijdens de aanmaak van de condities (zie Bijlage D) moet rekening gehouden worden met de gewenste eindconcentratie van 100 ng/ μ L. De concentratie van de DLD-1 cellijn wordt bepaald met een DropSense 96-toestel (DS96). Met behulp van onderstaande vergelijking (5) wordt berekend hoe de DLD-1 cellijn verdund moet worden naar een eindconcentratie van 100 ng/ μ L:

$$\text{Toe te voegen volume DLD-1} = \frac{\text{eindvolume conditie } (\mu\text{L}) * 100 \text{ ng}/\mu\text{L}}{\text{concentratie DLD-1 bepaald met DS96 (ng}/\mu\text{L)}} \quad (5)$$

Wanneer de juiste conditie (FA ~0,5%) gevonden is, wordt deze in een groot volume aangemaakt. Vooraleer een nieuwe positieve controle gebruikt wordt in routine, zijn vijf verschillende meetpunten nodig, afkomstig van vijf verschillende runs. Dit om de spreiding van de metingen in kaart te brengen en een gemiddelde te bepalen. De onder- en bovengrens worden berekend door eerst de standaardafwijking te bepalen. Deze standaardafwijking wordt dan maal een factor 3.5 gedaan en vervolgens gesommeerd of afgetrokken van de gemiddelde waarde. Voor elke gBlock-conditie wordt zo een controlegrafiek opgesteld met minstens vijf meetpunten. Hierbij worden zowel het aantal wildtype (WT) als mutante (mut) kopijen/ μ L opgevolgd. Deze worden bepaald door de QuantaSoft-software en weergegeven in de concentratiegrafiek zoals weergegeven in Figuur 27.

Indien bij de eerste vijf meetpunten de standaarddeviatie maal een factor 3.5 groter of gelijk is aan de gemiddeld bekomen waarde, wordt de nieuwe aangemaakte PC een zesde keer meegenomen. De controlegrafieken voor de singleplex gBlocks worden weergegeven in Bijlage E.

3.2.6 Aanmaak ddPCR-multiplexen

3.2.6.1 Werkwijze

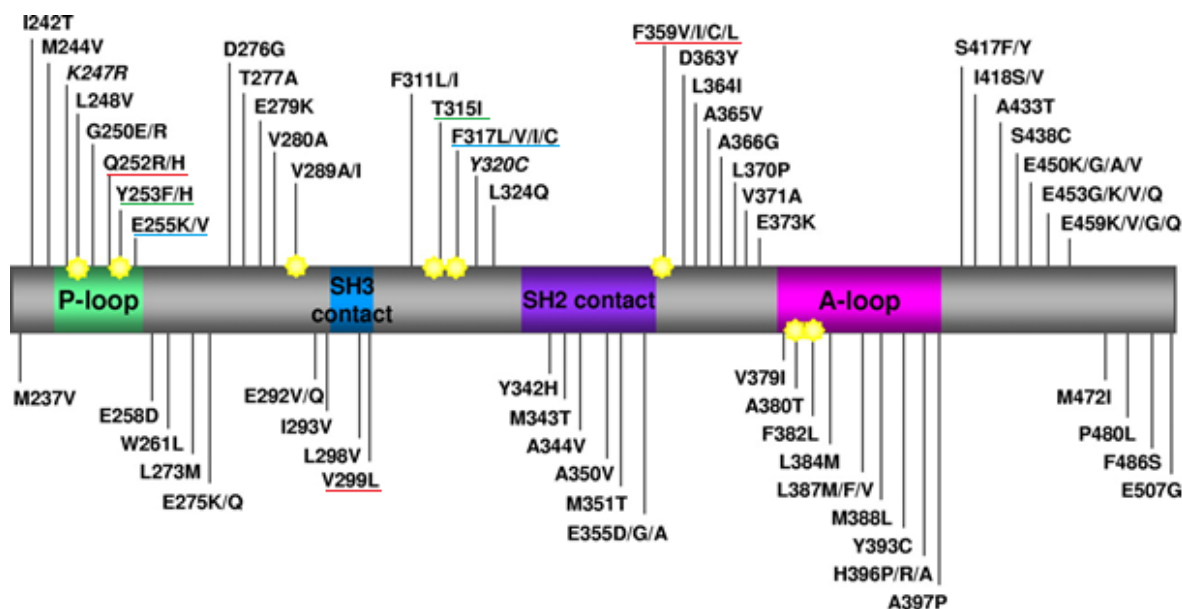
Tijdens het multiplexen worden verschillende primer/probe-assays gepooled binnen eenzelfde reactiemix. De keuze voor het samenbrengen van de verschillende primer/probe-assays is gebaseerd op de positie van de mutatie in het *BCR-ABL1*-gen en de ampliconlengte van elk assay zoals weergegeven in Tabel 8.

Tabel 8: Eigenschappen verschillende *ABL1*-assays en samenstelling multiplexen

Assay (positie)	Amplicon lengte (bp)	Aantal aminozuren (AZ)	Positie ± aantal AZ	Multiplex-reactiemix
p.Q252H	63	21	231-273	A
p.Y253H	100	33	220-286	B
p.E255K	61	21	234-276	C
p.V299L	61	21	278-320	A
p.T315I	70	24	291-339	B
p.F317L	62	21	296-338	C
p.F359V	72	24	335-383	A

Om interactie tussen primers en probes van verschillende assays te vermijden, worden enkel deze assays gepooled die niet overlappende amplicons hebben. Voor elk assay wordt een range bepaald door de verwachte ampliconlengte op te tellen en af te trekken van de positie van de mutatie. Uitgaande van deze range kan vervolgens besloten worden welke niet-overlappende assays samen gepooled kunnen worden.

In de onderstaande Figuur 33 wordt weergegeven op welke plaatsen in het *BCR-ABL1*-fusiegen de zeven verschillende puntmutaties zich situeren. De verschillende kleuren geven de puntmutaties aan die gemultiplexed kunnen worden.



Figuur 33: Positie puntmutaties in ABL1-kinasedomein: rood multiplex-reactiemix A met: p.Q252H, p.V299L en p.F359V, groen multiplex-reactiemix B met: p.Y253H en p.T315I en blauw multiplex-reactiemix C met: p.E255K en p.F317L [54]

Multiplex-reactiemix A bevat primer/probe-assays voor drie verschillende mutaties: p.Q252H, p.V299L en p.F359V. De assays voor de detectie van de p.Y253H- en p.T315I-mutaties worden gepooled in multiplex-reactiemix B. In multiplex-reactiemix C worden de p.E255K- en p.F317L-assays samengebracht.

3.2.6.2 Protocol

De aanmaak van de verschillende multiplex-reactiemixen wordt weergegeven in Tabel 9.

Tabel 9: Samenstelling multiplex-reactiemixen waarbij een eindvolume van 21 μ L wordt aangehouden

Reactiemix	#/reactie
Multiplex-reactiemix A	11 μ L ddPCR Supermix for Probes 1 μ L 20x mutant/wildtype p.Q252H-primer/probe 1 μ L 20x mutant/wildtype p.V299L-primer/probe 1 μ L 20x mutant/wildtype p.F359V-primer/probe 1 μ L MseI restrictie-enzym (2 U/ μ L) 6 μ L nuclease vrij water
Multiplex-reactiemix B	11 μ L ddPCR Supermix for Probes 1 μ L 20x mutant/wildtype p.Y253H-primer/probe 1 μ L 20x mutant/wildtype p.T315I-primer/probe 1 μ L MseI restrictie-enzym (2 U/ μ L) 7 μ L nuclease vrij water
Multiplex-reactiemix C	11 μ L ddPCR Supermix for Probes 1 μ L 20x mutant/wildtype p.E255K -primer/probe 1 μ L 20x mutant/wildtype p.F317L-primer/probe 1 μ L MseI restrictie-enzym (2 U/ μ L) 7 μ L nuclease vrij water

Voor de aanmaak van de multiplex worden de verschillende primer/probe-assays binnen de reactiemix samengevoegd in gelijke hoeveelheden. De multiplex-reactiemixen worden getest aan de hand van DLD-1, water en de 0.5% singleplex gBlock als positieve controle van de aparte assays in de multiplex.

In tweede instantie wordt ook een gBlock-mix aangemaakt per multiplex-reactiemix. Dit om het aantal controlestalen per reactie (en dus de kostprijs van de analyse) verder te drukken. De bereiding van de gBlock-mixen wordt weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10: Bereiding gBlock-mixen vertrekkende van singleplex gBlocks

gBlock-mix A ²	1 μ L p.Q252H 320 mutante kopijen/ μ L-gBlock 2 μ L p.F359V 168 mutante kopijen/ μ L-gBlock 37.6 μ L DLD-1 (213 ng/ μ L) 39.4 μ L TE-buffer (pH = 8.5)
gBlock-mix B	0.8 μ L p.Y253H 405 mutante kopijen/ μ L-gBlock 0.7 μ L p.T315I 304 mutante kopijen/ μ L-gBlock 40 μ L DLD-1 (200 ng/ μ L) 38.5 μ L TE-buffer (pH = 8.5)
gBlock-mix C	1 μ L p.E255K 250 mutante kopijen/ μ L-gBlock 0.7 μ L p.F317L 436 mutante kopijen/ μ L-gBlock 40 μ L DLD-1 (200 ng/ μ L) 38.3 μ L TE-buffer (pH = 8.5)

Er wordt vertrokken van de gBlock-verdunningen, gebruikt voor de aanmaak van singleplex gBlock-condities (zie Bijlage D). De aangemaakte gBlock-mix A, B en C worden getest in de respectievelijke multiplex-reactiemix A, B en C. Op basis van het resultaat kan bepaald worden of de gBlock-mixen geschikt zijn als positieve controle voor een eerste ABL1-mutatiescreening.

De aanvaardingscriteria voor de multiplexen zijn:

- duidelijke scheiding van de vier clusters: single-FAM-positief (blauw), FAM/HEX-positief (oranje), FAM/HEX-negatief (zwart) en single-HEX-positief (groen);
- detectie van de verschillende positieve controles.

Tot slot wordt geprobeerd om de hoeveelheid primer/probe-assay in de reactiemix te halveren. Dit kan de kostprijs per ddPCR-analyse halveren. De aanpassing in de reactiemix wordt weergegeven in onderstaande Tabel 11.

² p.V299L-primer/probe-assay wordt niet meegenomen in de gBlock-mix A, zie verder in §4.3.2

Tabel 11: Aanmaak verschillende multiplex-reactiemixen (eindvolume 21 μL) bij gebruik van halve hoeveelheden aan primer/probe-assay

Reactiemix	#/reactie
Multiplex-reactiemix A	11 μL ddPCR Supermix for Probes 0.5 μL 20x mutant/wildtype p.Q252H-primer/probe 0.5 μL 20x mutant/wildtype p.V299L-primer/probe 0.5 μL 20x mutant/wildtype p.F359V-primer/probe 1 μL MseI restrictie-enzym (2 U/ μL) 7.5 μL nuclease vrij water
Multiplex-reactiemix B	11 μL ddPCR Supermix for Probes 0.5 μL 20x mutant/wildtype p.Y253H-primer/probe 0.5 μL 20x mutant/wildtype p.T315I-primer/probe 1 μL MseI restrictie-enzym (2 U/ μL) 8 μL nuclease vrij water
Multiplex-reactiemix C	11 μL ddPCR Supermix for Probes 0.5 μL 20x mutant/wildtype p.E255K-primer/probe 0.5 μL 20x mutant/wildtype p.F317L-primer/probe 1 μL MseI restrictie-enzym (2 U/ μL) 8 μL nuclease vrij water

Er wordt getest of het multiplexen nog steeds het gewenste resultaat oplevert bij kleinere hoeveelheden aan primer/probe-assay in de reactiemix, rekening houdend met een eindvolume van 21 μL . In Bijlage F wordt het werkblad weergegeven voor de multiplex-reactiemix ABL1-mutatieanalyse met halve hoeveelheden aan primer/probe-assay in de reactiemix.

Nadien wordt opnieuw een controlegrafiek opgesteld van de multiplex-reactiemixen met halve volumes aan primer/probe-assay. Dit wordt weergegeven in Bijlage G. Hierbij wordt de spreiding van vijf verschillende meetpunten uit verschillende runs in kaart gebracht. De onder- en bovengrens worden opnieuw berekend door de standaardafwijking van de verschillende metingen te bepalen. Deze standaardafwijking wordt dan maal een factor 3.5 gedaan en gesommeerd of afgetrokken van de gemiddelde waarde.

Indien bij de eerste vijf meetpunten de standaardafwijking maal een factor 3.5 groter of gelijk is aan de gemiddeld bekomen waarde, wordt de nieuwe aangemaakte PC een zesde keer meegenomen.

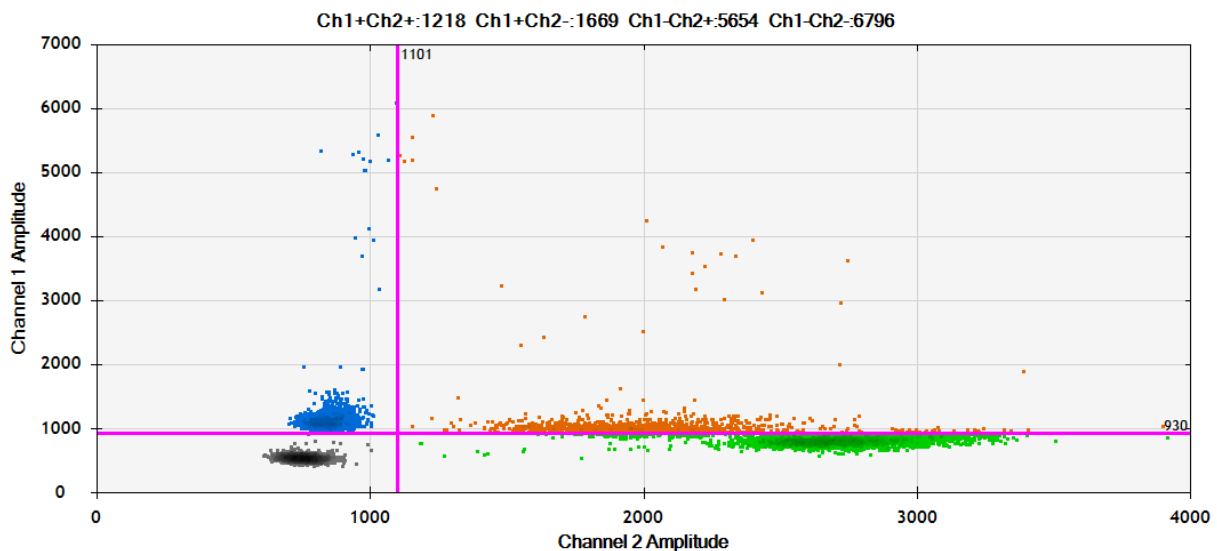
4 Resultaten

4.1 p.V299L-mutatieanalyse met ddPCR

Door de recente terugbetalingsvoorwaarde voor bosutinib, als derde generatie TKI, wordt de p.V299L-assay geoptimaliseerd. Nadien vindt een validatie plaats waarbij de juistheid, reproduceerbaarheid, robuustheid en detectielimietcontrole worden nagegaan.

4.1.1 Optimalisatie p.V299L-assay

In een eerste test wordt de *custom designed* p.V299L-assay uitgetest met het protocol, geoptimaliseerd en gevalideerd, voor de andere zes ABL1-mutatieassays (Figuur 34).



Figuur 34: Huidig protocol voor de p.V299L-mutatieanalyse met ddPCR vertoont slechte clusterscheiding

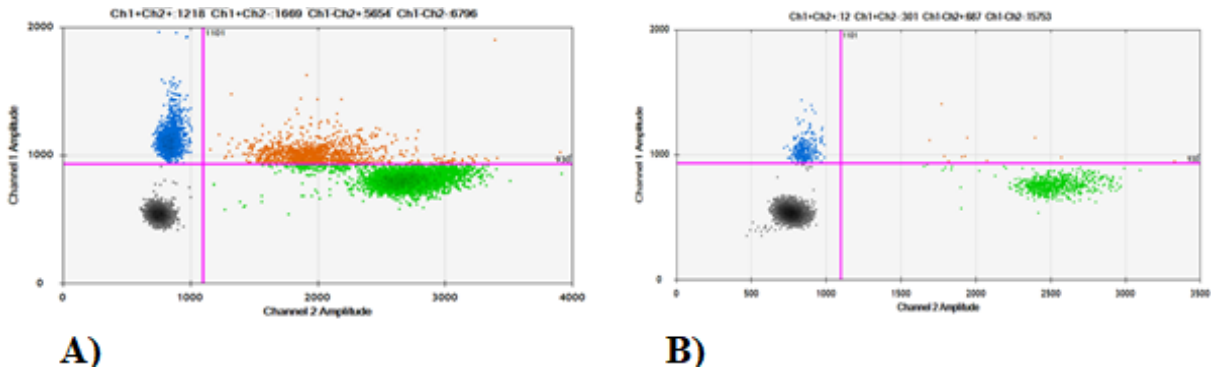
Het resultaat toont aan dat de vier clusters: single-FAM-positief (blauw), single-HEX-positief (groen), FAM/HEX-positief (oranje) en FAM/HEX-negatief (zwart) slecht van elkaar gescheiden zijn. Bovendien ligt de single-HEX-positieve wolk hoger dan de no-template-control-wolk. Dit bemoeilijkt verder een goed onderscheid van de clusters en verhoogt de kans op vals-positieve-resultaten.

Een slechte scheiding van de vier clusters kan veroorzaakt worden door een: suboptimale DNA-input, te hoge annealingtemperatuur, of het gebruikte restrictie-enzym (zie §3.2.2).

In parallel met de te optimaliseren p.V299L-assay worden de veranderde condities ook geverifieerd voor de andere zes ABL1-mutatieassays: p.Q252H, p.Y253H, p.E255K, p.F317L, p.F359V en p.T315I (zie verder bij §4.1.1.5).

4.1.1.1 Aanpassen DNA-input

In de huidige ddPCR-analyses wordt een DNA-input gebruikt van 100 ng/ μ L. Om een betere clusterscheiding te verkrijgen, wordt de starthoeveelheid aan DNA verlaagd om zo de concentratie aan aanwezige contaminanten te verlagen die mogelijk de ddPCR-reactie verstoren. Deze verstoringen worden waargenomen in een daling van de fluorescentiegraad. Voor deze analyse wordt een positieve patiënt (SR) in parallel getest aan 10 ng/ μ L en 100 ng/ μ L bij de huidige annealingtemperatuur van 55°C. De clusters van beide condities worden met elkaar vergeleken in Figuur 35.



Figuur 35: SR-staal met verschillende concentraties aan DNA-input: A) 100 ng/ μ L en B) 10 ng/ μ L bij een annealingtemperatuur van 55°C; een daling van de DNA-input heeft geen invloed op de clusterscheiding

Uit Figuur 35 kan besloten worden dat een verlaging van de concentratie weinig tot geen invloed heeft op de scheiding van de clusterwolken. De vier verschillende wolken liggen op dezelfde positie voor beide condities. Door een verlaging van de hoeveelheid aan DNA-input (B) zijn er logischerwijs minder mutant en wildtype druppels aanwezig.

4.1.1.2 Aanpassen annealingtemperatuur

4.1.1.2.1 Temperatuurgradiënt: 50°C – 60°C

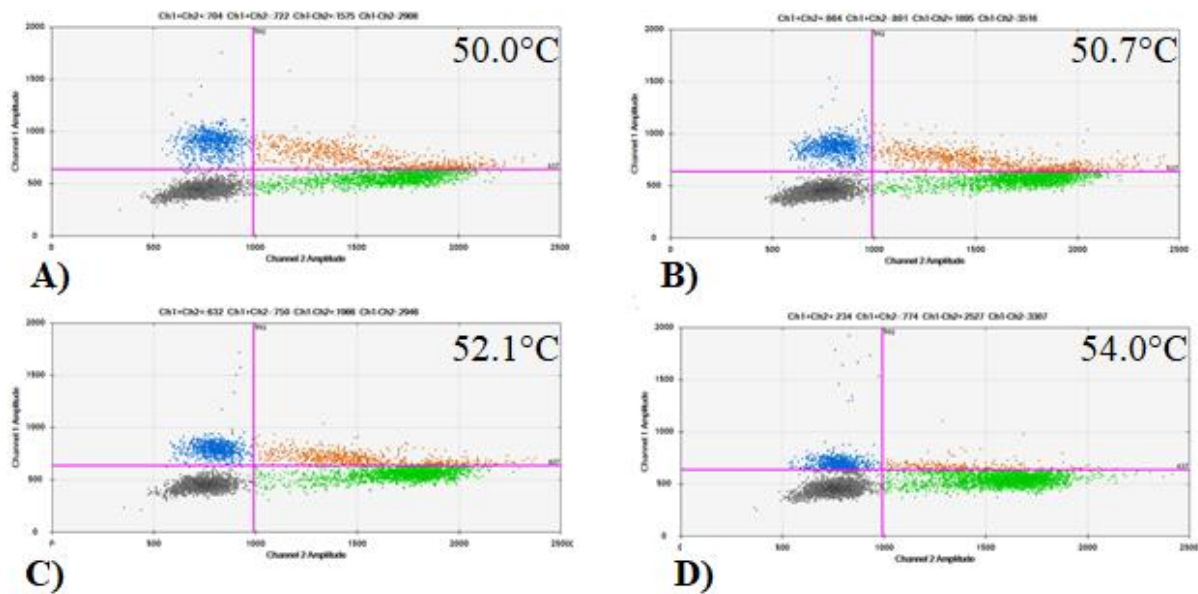
Een andere parameter die gevarieerd wordt, is de temperatuur van de annealingstap. De annealingstap zorgt ervoor dat de primers en de probes hybridiseren aan hun complementaire basenpaarsequentie op het verkregen ssDNA.

Acht verschillende annealingtemperaturen worden in parallel getest met behulp van een temperatuurgradiënt. De annealingtemperatuur wordt in acht stappen gevarieerd, vertrekkende van 60°C tot een temperatuur bereikt wordt van 50°C. Deze temperaturen liggen respectievelijk boven en onder de smelttemperatuur van 55°C, gebruikt in het standaard ddPCR-protocol (zie §3.2.2). Het gebruikte temperatuurprogramma wordt weergegeven in onderstaande Tabel 12.

Tabel 12: ddPCR-programma bij temperatuurgradiënt: 50°C – 60°C

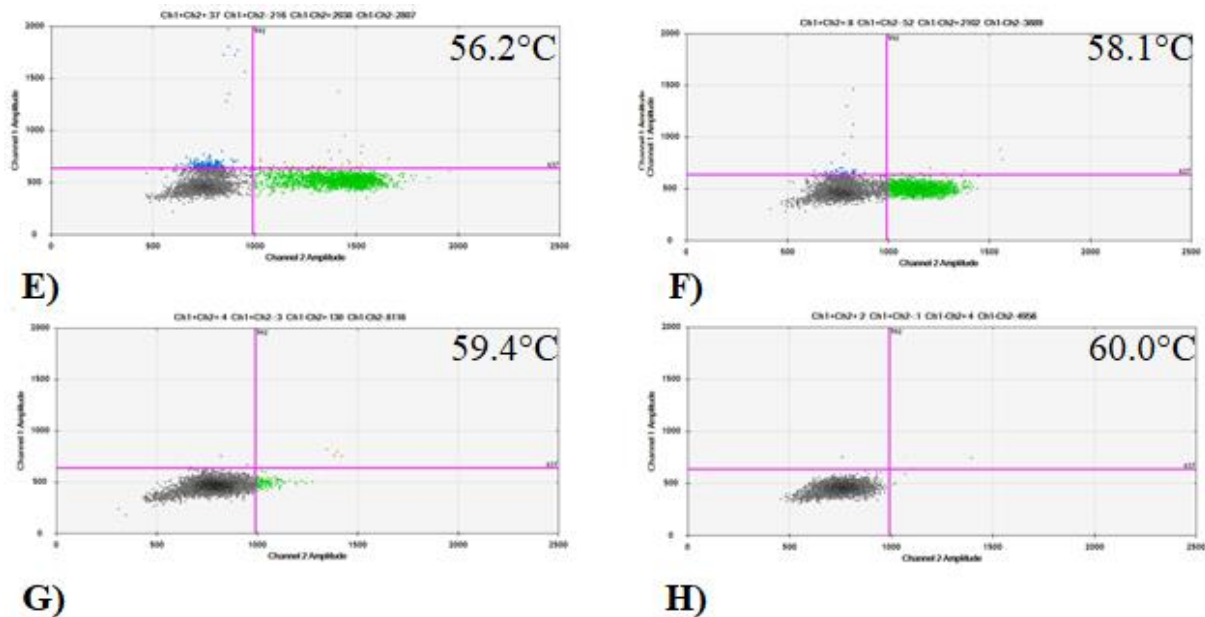
	Temperatuur	Tijd	Aantal cycli	Ramp rate
Activatie enzym	95.0°C	10 min	1	2°C/sec
Denaturatie	94.0°C	40 sec	40	2°C/sec
Annealing/extensie	60.0°C	1 min	40	2°C/sec
	59.4°C			
	58.1°C			
	56.2°C			
	54.0°C			
	52.1°C			
	50.7°C			
50.0°C				
Deactivatie enzym	98.0°C	10 min	1	2°C/sec
Hold	12.0°C	-	1	1°C/sec

In Figuur 36 en Figuur 37 wordt de invloed van een veranderde annealingtemperatuur op de scheiding van de clusterwolken weergegeven.



Figuur 36: Resultaten optimalisatie met annealingtemperatuur 50.0°C-60.0°C (1): goede clusterscheiding bij: A) 50.0°C, B) 50.7°C, C) 52.1°C, D) 54.0°C

Uitgaande van Figuur 36 kan besloten worden dat de temperatuurgradiënt een positieve invloed heeft uitgeoefend op de scheiding van de clusters bij temperaturen gelegen tussen 50°C en 54°C (A, B, C, D). Door een verlaagde annealingtemperatuur kunnen de primers en probes beter binden aan hun target. Hierdoor is de opbrengst aan PCR-product hoger. Het nadeel van een verlaagde annealingtemperatuur is de verhoogde kans op het vormen van specifieke PCR-fragmenten.



Figuur 37: Resultaten optimalisatie met annealingtemperatuur 50.0°C-60.0°C (2): slechte clusterscheiding bij: E) 56.2°C, F) 58.1°C, G) 59.4°C, H) 60.0°C

Door gebruik te maken van een te hoge annealingtemperatuur kunnen de primers en de probes minder goed hechten aan hun target zoals weergegeven in Figuur 37. Dit heeft tot gevolg dat minder PCR-producten gevormd worden. Dit is ook waarneembaar in een daling van de fluorescentiegraad (E, F, G, H), hierdoor kunnen de clusters moeilijk of niet meer van elkaar gescheiden worden.

Uitgaande van de resultaten in Figuur 36 en Figuur 37 kan besloten worden dat in het beste geval gewerkt wordt met een annealingtemperatuur gelegen tussen 50°C en 54°C. In een volgende test (zie §4.1.1.2.2) wordt het temperatuurinterval vernauwd zodat een optimalere en exactere annealingtemperatuur vastgelegd kan worden voor de p.V299L-assay.

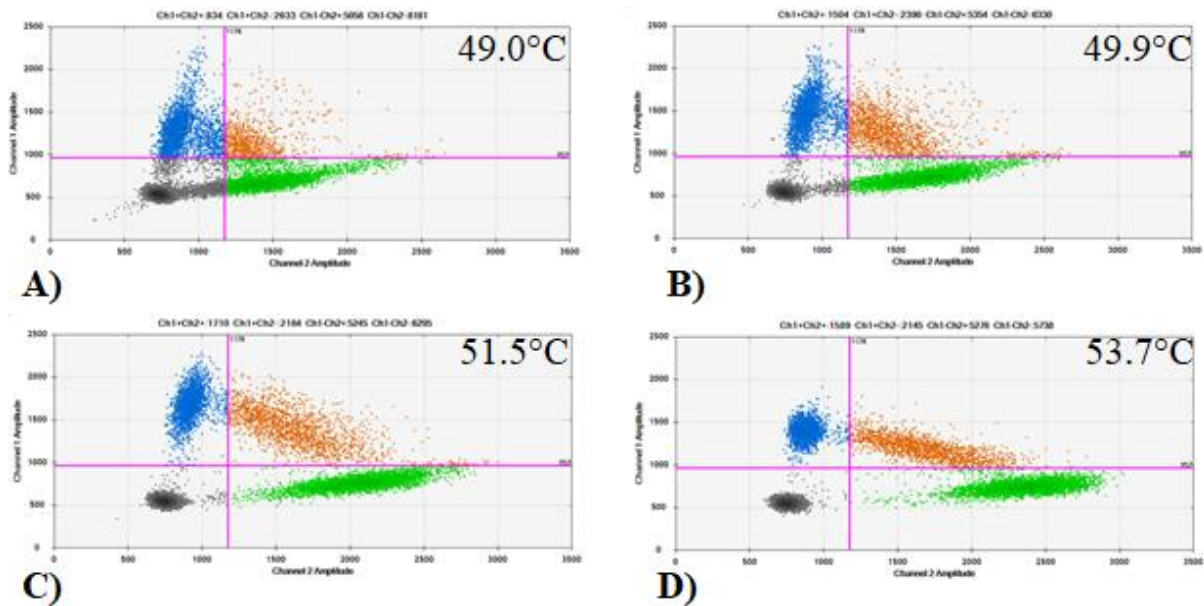
4.1.1.2.2 Temperatuurgradiënt: 49.0°C – 53.7°C

Er wordt opnieuw gewerkt met een temperatuurgradiënt waarbij het temperatuurinterval wordt vernauwd zoals weergegeven in Tabel 13 .

Tabel 13: ddPCR-programma bij temperatuurgradiënt: 49.0°C - 53.7°C

	Temperatuur	Tijd	Aantal cycli	Ramp rate
Annealing/extensie	53.7°C	1 min	40	2°C/sec
	51.5°C			
	49.9°C			
	49.0°C			

De annealingtemperatuur wordt parallel in vier verschillende stappen gevarieerd, vertrekkende van 53.7°C tot een temperatuur van 49.0°C bereikt wordt. De clusters voor de verschillende annealingtemperaturen worden in Figuur 38 met elkaar vergeleken.



Figuur 38: Resultaten optimalisatie met annealingtemperatuur 49.0°C-53.7°C: A) 49.0°C, B) 49.9°C, C) 51.5°C en D) 53.7°C

De beste resultaten worden bekomen bij een temperatuur van 51.5°C (C). Hier liggen de clusters voldoende van elkaar gescheiden en liggen de druppels compacter bij elkaar ten opzichte van A en B. Bij lagere annealingtemperaturen (A, B) worden de clusters in de breedterichting op elkaar gedrukt. De probes en primers kunnen hier gemakkelijker binden en zijn minder selectief waardoor de kans op het vormen van aspecifieke PCR-fragmenten groter wordt. Dit is ook waarneembaar in de aanwezigheid van *droplet-rain*. Bij lagere temperaturen is de hoeveelheid aan droplet-rain groter, de druppels liggen hier verder van elkaar verspreid.

Bij hogere temperaturen (D) worden de clusters in de lengterichting op elkaar gedrukt. Dit wijst op een daling van de FAM-fluorescentiegraad door een verhoogde selectiviteit en specificiteit van de primers en de probes.

4.1.1.3 Temperatuurgradiënt voor p.T315I- en p.V299L-assays

Doordat de terugbetalingsvoorwaarde voor bosutinib zowel de afwezigheid van de p.V299L- als de p.T315I-puntmutatie omvat, moeten beide puntmutaties gelijktijdig opgespoord kunnen worden. Idealiter kan dezelfde annealingtemperatuur gebruikt worden voor beide ABL1-mutatieassays.

In een volgende test wordt de meest optimale annealingtemperatuur gezocht die een juist en betrouwbaar resultaat oplevert voor beide assays. Er wordt een temperatuurgradiënt getest die gelegen is rond de optimale annealingtemperatuur van de p.V299L-assay (zie §4.1.1.2), namelijk 51.5°C.

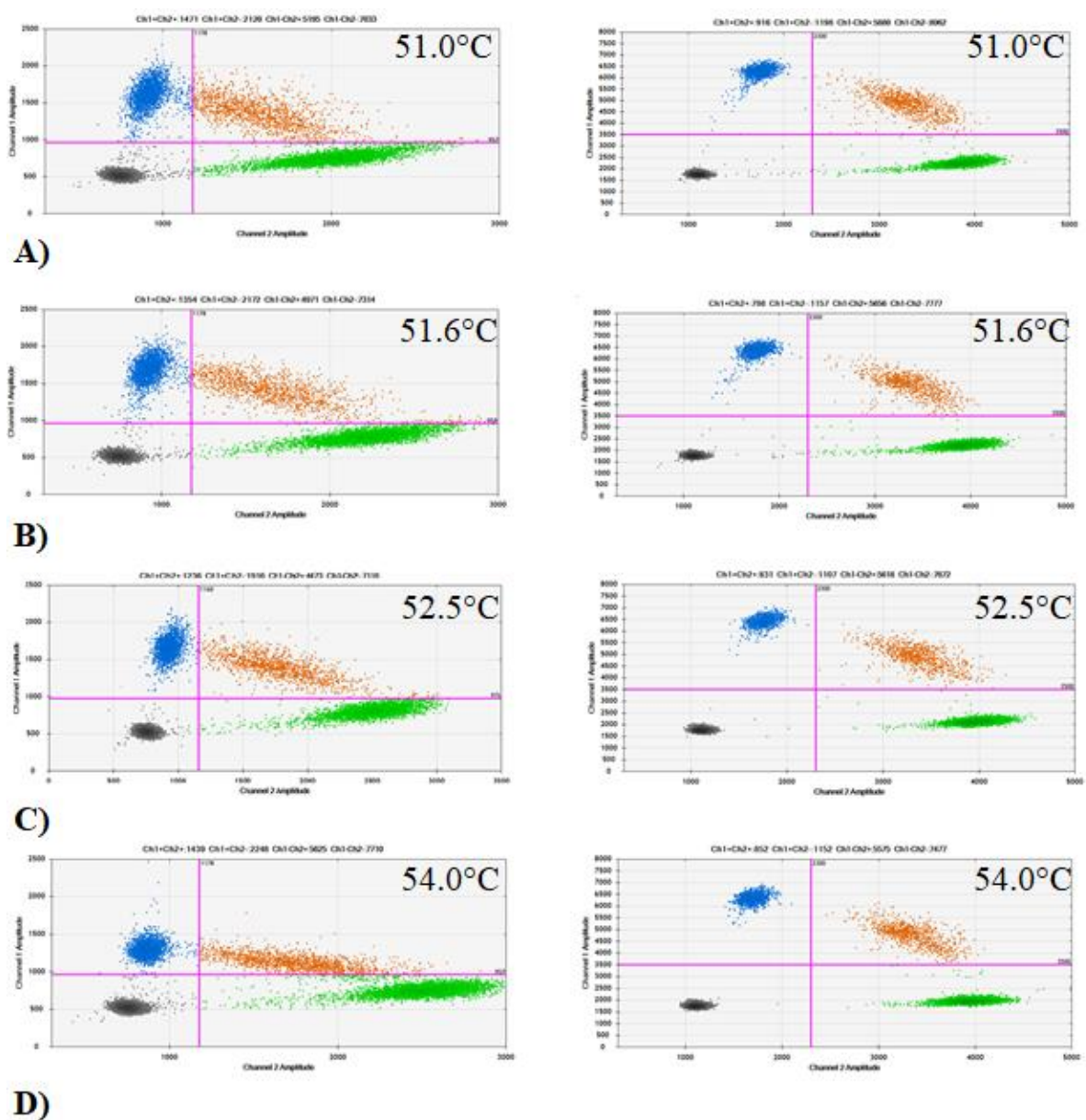
De gebruikte temperatuurgradiënt voor de annealingtemperatuur van beide assays wordt weergegeven in Tabel 14.

Tabel 14: Temperatuurgradiënt voor p.V299L- p.T315I-assay: 51.0°C-54.0°C

	Temperatuur	Tijd	Aantal cycli	Ramp rate
Annealing/extensie	54.0 °C 52.5 °C 51.6 °C 51.0 °C	1 min	40	2°C/sec

In parallel worden vier verschillende annealingtemperaturen toegepast. Startend van 54.0°C tot een temperatuur van 51.0°C bereikt wordt.

Voor deze test worden patiëntenstalen gebruikt, positief voor de p.V299L- of de p.T315I-mutatie. In Figuur 39 worden de bekomen analyseresultaten weergegeven.



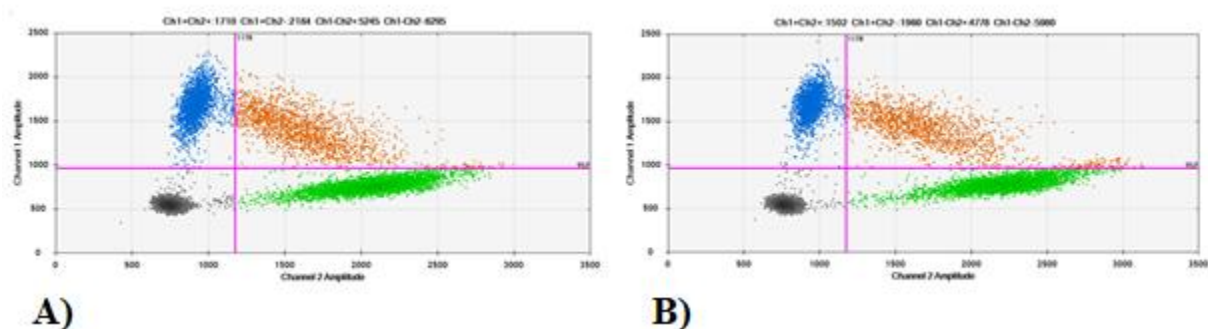
Figuur 39: Invloed annealingtemperatuur op p.V299L- (links) en p.T315I-assay (rechts) met A) 51°C, B) 51.6°C, C) 52.5°C en D) 54°C

Uitgaande van Figuur 39 kan besloten worden dat de beste scheiding van de clusters voor de p.V299L-assay (linkerkolom) wordt bekomen bij een temperatuur van 52.5°C (C). De druppels liggen bij de dubbelpositieve clusters (oranje) compacter bij elkaar en is er minder droplet-rain aanwezig ten opzichte van de clusters verkregen bij lagere temperaturen (A en B). Deze droplet-rain is rechtstreeks het gevolg van een aspecifieke ddPCR-reactie. Ook voor de p.T315I-assay (rechterkolom) zijn de vier clusterwolken goed gescheiden bij een temperatuur van 52.5°C. Dit betekent dat beide puntmutaties gelijktijdig opgespoord kunnen worden bij een annealingtemperatuur van 52.5°C.

Door een verandering van de annealingtemperatuur moeten de huidige thresholds van de p.T315I-assay (Ch1-Ch2): 4013-2300 (zie §3.2.3) aangepast worden naar 3500-2300. De threshold-verandering heeft geen invloed op de fractional abundance van de positieve controle voor de p.T315I-mutatieanalyse, ondanks een verandering van de annealingtemperatuur.

4.1.1.4 Aanpassen restrictie-enzym

In deze test wordt nagegaan of het gebruikte restrictie-enzym een invloed uitoefent op de scheiding van de clusters bij de gevonden optimale annealingtemperatuur van 51.5°C (zie §4.1.1.2). Als restrictie-enzym wordt gebruik gemaakt van enerzijds MseI en anderzijds HaeIII (Figuur 40).

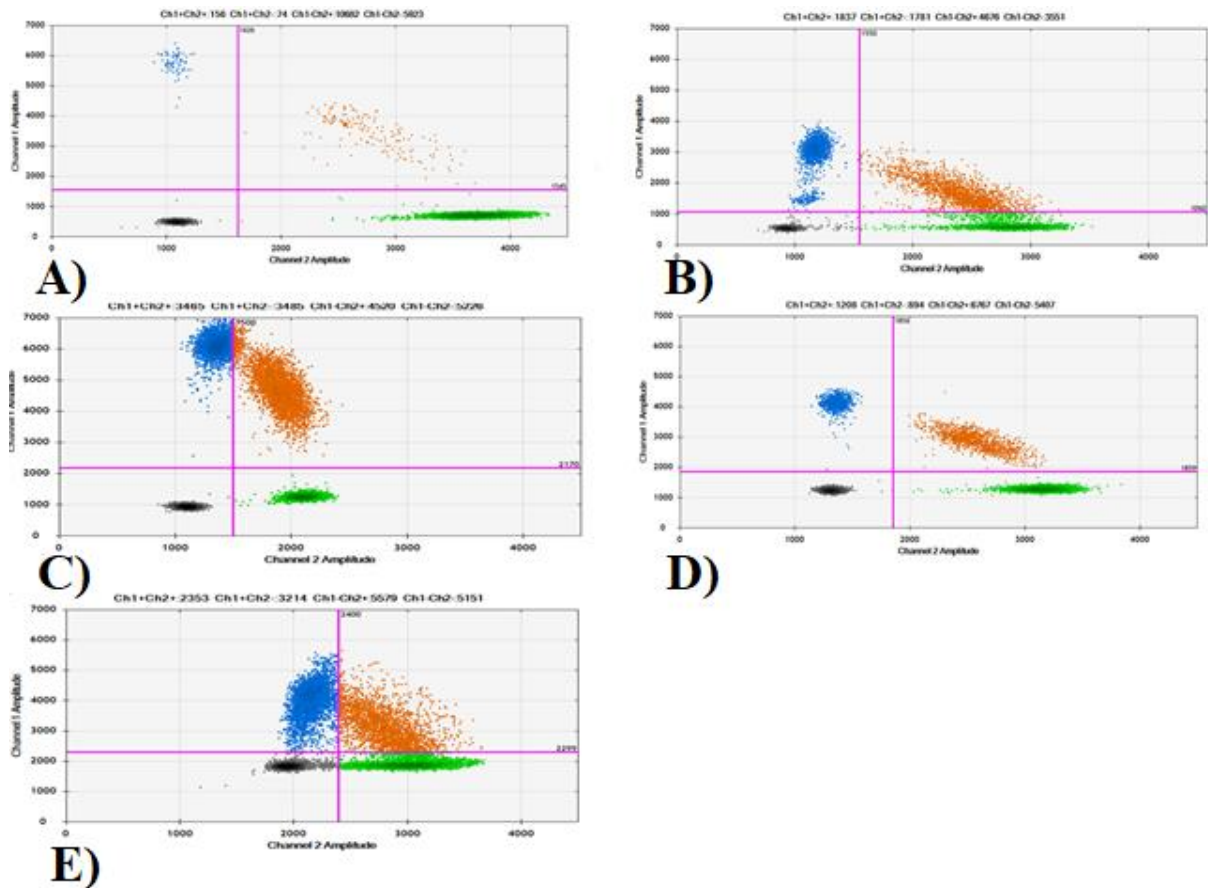


Figuur 40: Resultaten optimalisatie met verschillende restrictie-enzymen heeft geen invloed op de ligging van de vier clusterwolken: A) MseI en B) HaeIII

Het gebruik van verschillende restrictie-enzymen (MseI en HaeIII) heeft geen invloed op de scheiding van de clusters zoals weergegeven wordt in Figuur 40. De clusters zijn gelegen op dezelfde positie met dezelfde graad van fluorescentie (FAM en HEX). Aangezien bij de overige zes ABL1-mutatieassays MseI gebruikt wordt als restrictie-enzym en om de *laboflow* zo eenvoudig mogelijk te houden, wordt beslist om verder te werken met MseI.

4.1.1.5 Verificatie andere ABL1-mutatieassays met gewijzigd protocol

De overige vijf ABL1-assays (p.Q252H, p.Y253H, p.E255K, p.F317L en p.F359V) worden in deze test geverifieerd bij een annealingtemperatuur van 52.5°C, hierbij wordt gebruik gemaakt van gekende positieve stalen (Figuur 41). De p.T315I-assay werd reeds geverifieerd in §4.1.1.4.



Figuur 41: Invloed annealingtemperatuur van 52.5°C op overige vijf ABL1-mutaties: A) p.Q252H, B) p.Y253H, C) p.E255K, D) p.F317L en E) p.F359V

Uitgaande van Figuur 41 kan besloten worden dat voor de p.Q252H- (A), p.E255K- (C), p.F317L- (D) en p.F359V-assays (E) de vier clusters afzonderlijk kunnen waargenomen worden bij een annealingtemperatuur van 52.5°C. De voorgaande thresholds (weergegeven in Tabel 7 §3.2.3) kunnen behouden blijven. Bij de p.Y253H-assay (B) worden de clusters minder goed gescheiden met de huidig bestaande thresholds. Bovendien worden extra clusters waargenomen. Wanneer vergeleken wordt met het vroegere resultaat van hetzelfde staal bij een annealingtemperatuur van 55°C, bleek hetzelfde fenomeen op te treden. Deze extra clusters kunnen afkomstig zijn van onzuiverheden in het DNA-staal die de PCR-reactie negatief beïnvloeden.

Vervolgens wordt in Tabel 15 de bekomen FA vergeleken bij een annealingtemperatuur van respectievelijk 52.5°C en 55°C.

Tabel 15: Resultaten thresholds bij 52.5 °C en vergelijking FA bij 55°C en 52.5°C

Assay	Threshold	FA bij 55°C	FA bij 52.5°C
p.Q252H	1545-1626	1.4%	1.3%
p.Y253H	1060-1550	33%	31%
p.E255K	2170-1500	48%	46%
p.F317L	1859-1856	17%	16%
p.F359V	2750-2800	39%	38%

Hieruit kan geconcludeerd worden dat een verlaging van de annealingtemperatuur van 55°C naar 52.5°C geen invloed uitoefent op de thresholds en de FA. De primers en probes kunnen nog even goed hybridiseren aan het target wanneer een lagere annealingtemperatuur gebruikt wordt.

Hoewel alle assays werken bij een annealingtemperatuur van 52.5°C, wordt op basis van het resultaat met de p.V299L-gBlock, besloten om verder te werken bij een annealingtemperatuur van 55°C (zie verder bij §4.2.2.2). De ddPCR-techniek wordt immers nog voor andere toepassingen gebruikt binnen de routine diagnostiek daarom wordt gestreefd naar zoveel mogelijk identieke protocols om de laboflow zo eenvoudig mogelijk te houden. Een verdere verificatie van de overige ABL1-assays is daarom overbodig geworden. Hierbij wordt normaliter nog de impact op de false positive rate (FPR) en detectielimiet nagegaan.

4.1.1.6 Resultaat optimalisatie protocol voor p.V299L-assay

Uit de optimalisatie is gebleken dat de p.V299L-assay binnen de routine gebruikt kan worden met:

- DNA-input: 100 ng/μL;
- restrictie-enzym: MseI;
- annealingtemperatuur: 55°C;
- eerstelijnscontrole bestaande uit: negatieve DLD-1-controle, positieve p.V299L-gBlock-controle (zie verder §4.2.2) en no-template-controle (water).

Voor de p.V299L-mutatieanalyse worden de thresholds, op basis van de p.V299L-gBlock, vastgelegd bij (Ch1-Ch2): 1850-1555. De ddPCR-analyse wordt uitgevoerd volgens het standaardtemperatuurprogramma zoals weergegeven in Tabel 6 (zie ook §3.2.1). Hetzelfde protocol dat beschreven staat in Bijlage B wordt toegepast.

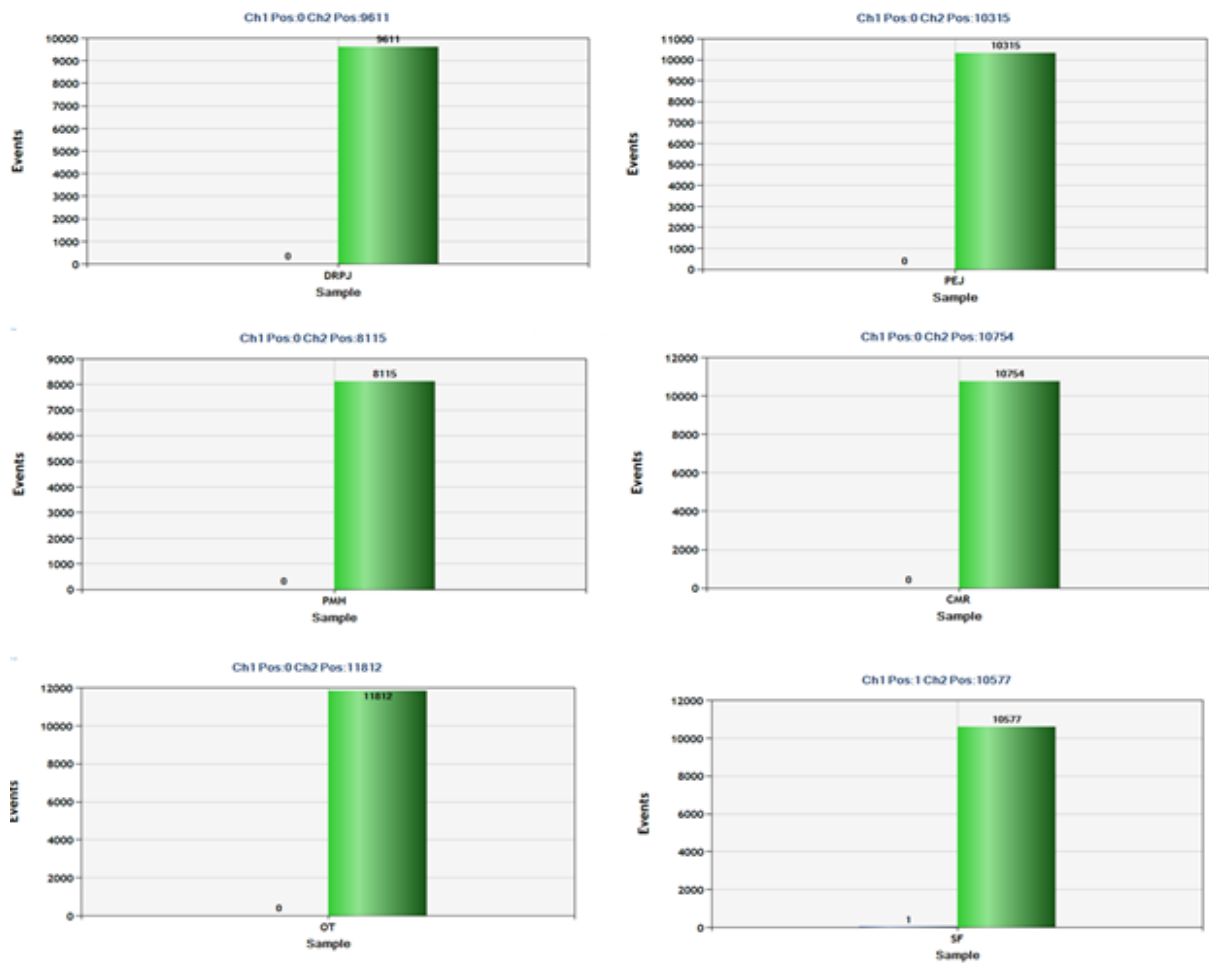
4.1.2 Validatie p.V299L-assay

4.1.2.1 Juistheid

Onder de juistheid wordt de mate verstaan waarin de uitgekomen resultaten een correcte weergave is van de werkelijkheid. Dit wordt bepaald met behulp van een derdelijnsstudie en met gekende positieve en negatieve p.V299L-patiëntenstalen.

Uit de ABL1-mutatieanalyse van de derdelijnscontrole-stalen kan besloten worden dat de vier KDM-stalen negatief zijn voor de ABL1-p.V299L-mutatie. De resultaten gegenereerd met de hier te valideren methode zijn juist. Voor de negatieve p.V299L-patiëntenstalen wordt de false positive rate (FPR) bepaald zoals weergegeven in Figuur 42 en Tabel 16. Aangezien gebruik gemaakt wordt van negatieve stalen wordt verwacht dat deze ook effectief een FAM-negatief

resultaat opleveren. Tijdens de validatie worden ook stalen van gekende positieve patiënten getest (SR zie §4.1.1). De geteste positieve stalen leverden een positief resultaat op.



Figuur 42: Bepaling FPR met rechterbalk: aantal single-HEX-positieve druppels en linkerbalk: aantal single-FAM-positieve druppels

Channel 1 stelt het aantal single-FAM-positieve druppels (mutant) voor. Channel 2 geeft het aantal single-HEX-positieve druppels (wildtype) weer.

Tabel 16: False positive rate voor p.V299L-assay bij 55°C

Initialen negatief patiëntenstaal	Aantal FAM-positieve druppels
DRPJ	0
PEJ	0
PMH	0
CMR	0
OT	0
SF	1
Gemiddelde	< 1

Uitgaande van Figuur 42 en Tabel 16 wordt vastgesteld dat een FPR met een gemiddelde waarde kleiner dan 1 bekomen wordt voor de p.V299L-mutatieassay. Er kan dus besloten worden dat aan de juistheid is voldaan.

4.1.2.2 Reproduceerbaarheid

Onder de reproduceerbaarheid wordt de mate van overeenstemming tussen meetresultaten verstaan wanneer gewerkt wordt onder wisselende omstandigheden.

De inter-run en intra-runvariatie wordt vergeleken voor twee verschillende positieve patiëntenstalen die verdund worden tot 100 ng/μL (SM) en 10 ng/μL (SR). In de onderstaande tabellen (Tabel 17 en Tabel 18) worden de initialen van de patiënt samen met het ddPCR-resultaat weergegeven. Hierbij wordt de FA bij de intra-run en inter-run vergeleken.

Tabel 17: Resultaten intra-runvariatie p.V299L-assay (in dezelfde run)

Initialen patiënt	ddPCR-resultaat	s_{RW}^3	$\Delta ddPCR - resultaat$
SM	0.43% 0.30%	0.09%	0.13%
SR	30.7% 32.4%	1.20%	1.7%

Tabel 18: Resultaten inter-runvariatie p.V299L-assay (in een andere run)

Initialen patiënt	ddPCR-resultaat	s_{RW}	$\Delta ddPCR - resultaat$
SM	0.36% 0.77%	0.30%	0.41%
SR	32% 42%	7.1%	10%

De intra-runwaarden tonen aan dat voldaan is aan de reproduceerbaarheid (Tabel 17). Voor het SM-staal is een spreiding van 0.09% op de bekomen FA en voor het SR-staal bedraagt deze spreiding 1.20%. Dit wordt beschouwd als een niet-significant afwijkend gedrag. Ook de inter-runwaarden vertonen geen significant afwijkend gedrag. Voor het SM-staal en SR-staal wordt een spreiding van respectievelijk 0.30% en 7.1% waargenomen.

4.1.2.3 Robuustheid

De robuustheid is de mate van ongevoeligheid van het meetresultaat voor afwijkingen binnen de uitvoering. De eerste testen met de p.V299L-assay worden uitgevoerd door twee verschillende operatoren. Uitgaande van de bekomen resultaten blijkt duidelijk dat de operator geen invloed heeft op het resultaat. Het aantal druppels per staal verschilt nauwelijks tussen de verschillende extractiemethodes. Er kan geconcludeerd worden dat de extractiemethode geen invloed uitoefent op de resultaten bekomen met ddPCR. Verschillende DNA-stalen die geëxtraheerd worden uit het bloed of het beenmerg worden getest. Het aantal druppels dat gegenereerd worden, vertonen geen significante verschillen, met andere woorden: de staalsoort heeft geen enkele invloed op de analyseresultaten bekomen met ddPCR.

³ De standaarddeviatie wordt berekend met vergelijking (3) zie §3.2.4.2

4.1.2.4 Detectielimietcontrole

De detectielimiet (LOD) is de laagste concentratie van een component waarvan de aanwezigheid nog met een bepaalde betrouwbaarheid kan worden vastgesteld (zie Tabel 19). Als positieve controle wordt gebruik gemaakt van de aangemaakte p.V299L-gBlock (zie §4.2.2) met een FA van ongeveer 0.5%.

Tabel 19: Resultaten detectielimietcontrole: FA p.V299L-gBlock bij verschillende runs

p.V299L-gBlock	Fractional abundance
Run 1	0.345%
Run 2	0.295%
Run 3	0.365%
Run 4	0.420%
S_{RW}	0.0517%

Uit Tabel 19 wordt een gemiddelde FA van 0.36% bekomen. De p.V299L-gBlock is dus uitermate geschikt als detectielimietcontrole. De betrouwbaarheid wordt gegarandeerd omdat de standaardafwijking van deze waardes slechts 0.0517% bedraagt.

4.1.2.5 Algemeen besluit validatie

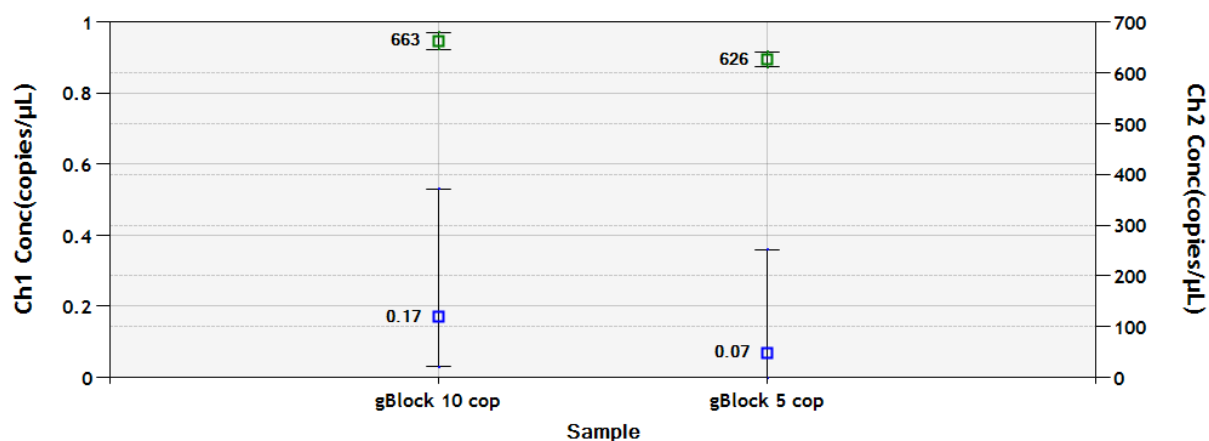
Uit de validatie kan besloten worden dat de p.V299L-puntmutatie opgespoord kan worden met droplet digitale PCR. De hier gevalideerde ddPCR-methode levert de juiste resultaten op vergeleken met de huidige routine testen, eerstelijnscontrole en derdelijnscontrole. De resultaten zijn reproduceerbaar en de methode is robuust.

4.2 Singleplex gBlocks als positieve controle

4.2.1 Validatie p.F359V-gBlock

4.2.1.1 Resultaten

Om condities aan te maken die theoretisch een resultaat van vijf en tien mutante kopijen/ μL opleveren, wordt vertrokken van de 217 mutante kopijen/ μL -verdunding, aangemaakt in de seriële verdunningsreeks (zie §3.2.5), zoals weergegeven in Figuur 43. De huidige thresholds van het p.F359V-assay worden behouden voor de validatie van de p.F359V-gBlock (Ch1-Ch2): 2750-2800.



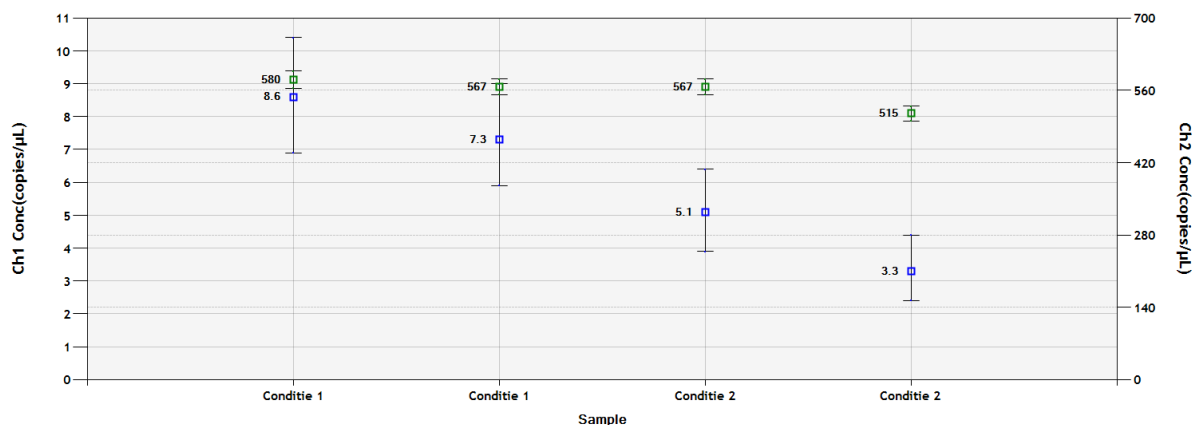
Figuur 43: Concentratiegrafiek voor p.F359V-gBlock (1): de verwachte 10 en 5 mutante kopijen/ μL leveren respectievelijk 0.17 en 0.07 mutante kopijen/ μL op

Na een eerste ddPCR-analyse blijkt dat slechts 0.17 en 0.07 mutante kopijen/ μL aanwezig zijn voor de respectievelijk verwachte 10 en 5 mutante kopijen/ μL (Figuur 43). Dit toont aan dat de aangemaakte 217 mutante kopijen/ μL -verdunding en eveneens de overige aangemaakte verdunningen, binnen de verdunningsreeks, sterk afwijken van de theoretisch berekende waarde. Daarom wordt vervolgens proefondervindelijk bepaald hoeveel kopijen/ μL mutant materiaal effectief aanwezig zijn in een voorgaande $2.17 \cdot 10^5$ -tussenverdunding. Vertrekkende van dit ddPCR-resultaat, wordt berekend dat slechts 5500 mutante kopijen/ μL aanwezig zijn, terwijl in theorie $2.17 \cdot 10^5$ mutante kopijen/ μL worden verwacht.

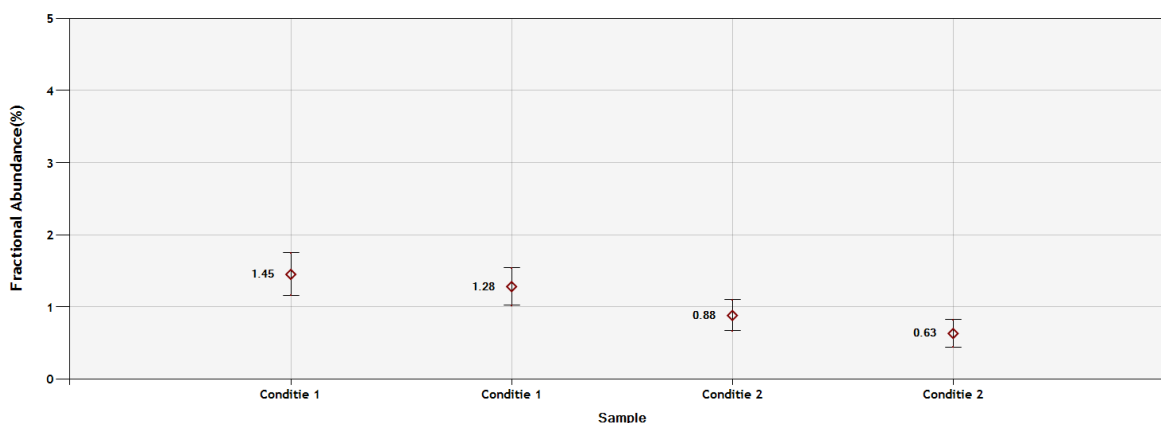
Aan de hand van deze informatie wordt berekend op welke manier de 5 en 10 mutante kopijen/ μL -condities aangemaakt moeten worden. Hierbij wordt eerst een tussenverdunding van 200 mutante kopijen/ μL aangemaakt door de 5500 mutante kopijen/ μL -conditie 28 keer te verdunnen in TE-buffer (pH 8.5). Van deze 200 mutante kopijen/ μL -tussenverdunding worden vervolgens de 5 en 10 mutanten kopijen/ μL -condities aangemaakt (zie Tabel 20) en geanalyseerd zoals weergegeven in Figuur 44 en Figuur 45.

Tabel 20: Bereiding p.F359V-gBlock: 5 en 10 mutante kopijen/ μ L uit de 200 mutante kopijen/ μ L-tussenverdunding

Conditie 1 (Verwachting: ~ 10 mutante kopijen/ μ L)	9.3 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 1 μ L 200 mutante kopijen/ μ L-gBlock 9.7 μ L TE-buffer (pH = 8.5)
Conditie 2 (Verwachting: ~ 5 mutante kopijen/ μ L)	18.5 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 1 μ L 200 mutante kopijen/ μ L-gBlock 20.5 μ L TE-buffer (pH = 8.5)



Figuur 44: Concentratiegrafiek voor p.F359V-gBlock (2) met: conditie 1 gemiddeld 8 en conditie 2 gemiddeld 4 mutante kopijen/ μ L



Figuur 45: FA voor p.F359V-gBlock met: conditie 1 gemiddeld 1.4% en conditie 2 gemiddeld 0.76%

Uitgaande van Figuur 44 kan besloten worden dat conditie 1 en 2 respectievelijk gemiddeld 8 en 4 mutante kopijen/ μ L bevatten. De FA voor conditie 1 en 2 bedraagt respectievelijk 1.4% en 0.76% zoals weergegeven in Figuur 45.

4.2.1.2 Algemeen besluit p.F359V-gBlock

Door proefondervindelijk te werken, wordt een p.F359V-gBlock-verdunding in DLD-1 en TE aangemaakt met gemiddeld 4 mutante kopijen/ μ L en een FA van ongeveer 0.5%.

Tijdens deze testen werd duidelijk dat het aantal mutante kopijen/ μ L van de aangemaakte verdunningsreeks sterk afwijkt van de theoretisch verwachte reeks. Dit kan verklaard worden

doordat te grote verdunningsstappen (duizendvoudig) gemaakt werden om tot een werkbare gBlock-verdunning te komen. Voor de overige gBlocks zal hiermee rekening worden gehouden door te werken met kleinere verdunningsstappen binnen de seriële verdunningsreeks.

4.2.2 Validatie p.V299L-gBlock

4.2.2.1 Resultaten

Omdat de voorgaande seriële verdunningsreeks van de p.F359V-gBlock met te grote tussenstappen verliep, wordt de seriële verdunning voor de p.V299L-gBlock (in TE-buffer) ditmaal anders uitgevoerd zoals weergegeven in Figuur 32 (§3.2.5). Deze 217 mutante kopijen/ μ L-conditie wordt getest in een eerste ddPCR-analyse.

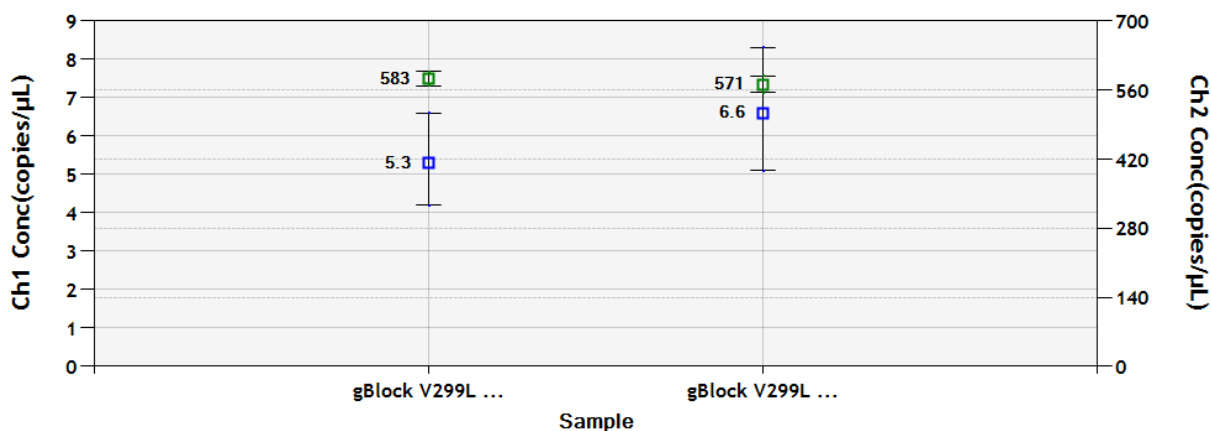
De thresholds worden ingesteld op (Ch1-Ch2): 1850-1555, zoals gevalideerd in §4.1.2. Na een eerste ddPCR-analyse worden geen mutante kopijen/ μ L waargenomen. Opnieuw wijst dit erop dat, ondanks de kleinere verdunningsstappen, de aangemaakte 217 mutante kopijen/ μ L-verdunning afwijkt van de theoretisch berekende.

Er wordt proefondervindelijk bepaald hoeveel mutante kopijen/ μ L effectief aanwezig zijn in een voorgaande $2.17 \cdot 10^4$ mutante kopijen/ μ L-tussenverdunning. Uit de analyse blijkt dat de $2.17 \cdot 10^4$ -tussenverdunning gemiddeld 190 mutante kopijen/ μ L bevat. Er wordt een nieuwe 5 mutante kopijen/ μ L-conditie aangemaakt in DLD-1 en TE zoals weergegeven in (Tabel 21).

Tabel 21: Bereiding p.V299L-gBlock voor 5 mutante kopijen/ μ L-conditie uit de 190 mutante kopijen/ μ L-tussenverdunning

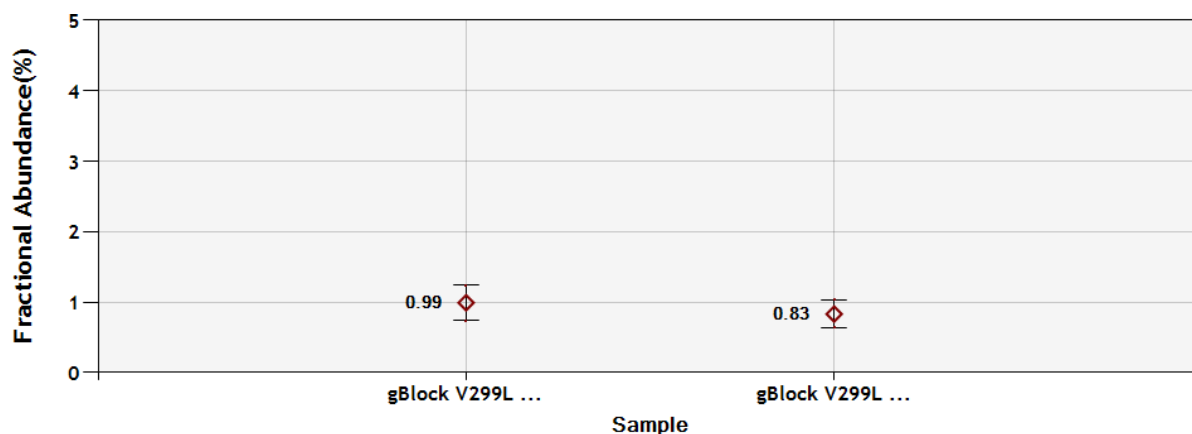
Conditie (Verwachting: ~5 mutante kopijen/ μ L)	18.5 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 1 μ L 190 mutante kopijen/ μ L-gBlock 20.5 μ L TE-buffer (pH = 8.5)
--	--

Voor de aanmaak van de nieuwe conditie wordt de 190 mutante kopijen/ μ L-verdunning 40 keer verdund en uitgetest zoals weergegeven in Figuur 46 en Figuur 47.



Figuur 46: Concentratiegrafiek p.V299L-gBlock (1): gemiddeld 6 mutante kopijen/ μ L in de conditie waarbij de 190 mutante kopijen/ μ L 40 keer werd verdund

Uit Figuur 46 blijkt dat het aantal mutante kopijen/ μL gemiddeld gelijk is aan 6 voor de aangemaakte conditie 1.



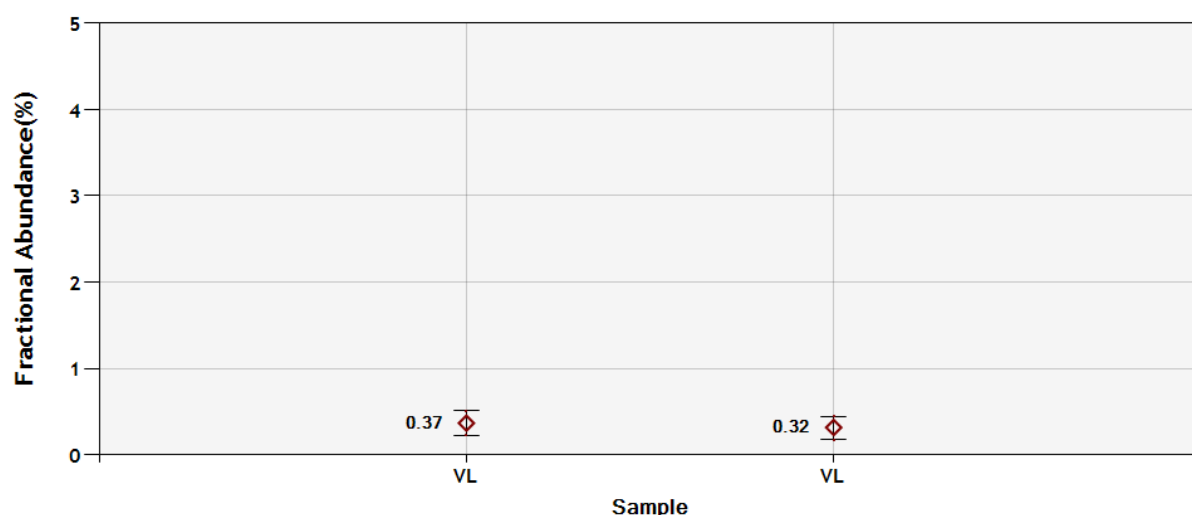
Figuur 47: Gemiddelde FA p.V299L-gBlock (1): 0.91% voor de conditie waarbij de 190 mutante kopijen/ μL 40 keer werd verdund

De FA is gelegen rond 0.9% (Figuur 47), terwijl gestreefd wordt naar een positieve controle met een FA van ongeveer 0.5%. Om een FA te benaderen van 0.5% wordt de voorgaande conditie (zie Tabel 21) aangepast zoals weergegeven in Tabel 22.

Tabel 22: Bereiding p.V299L-gBlock met FA 0.5%

Conditie (Verwachting: FA ~ 0.5%)	37 μL DLD-1 (216 ng/ μL) 1 μL 190 mutante kopijen/ μL -gBlock 42 μL TE-buffer
--------------------------------------	---

De 190 mutante kopijen/ μL -gBlock wordt 80 keer verdund in DLD-1 en TE-buffer. Nadien volgt opnieuw een ddPCR-analyse zoals weergegeven in Figuur 48.

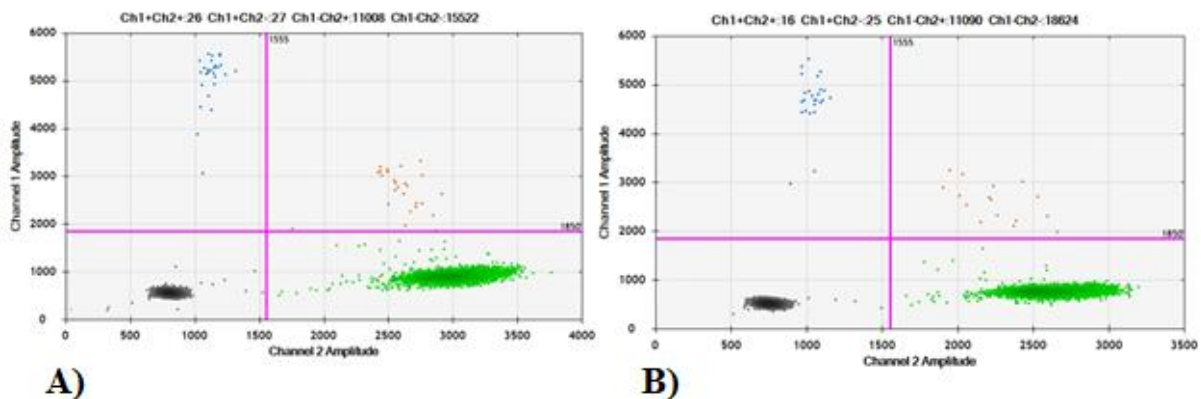


Figuur 48: Gemiddelde FA p.V299L-gBlock (2): 0.35% waarbij de 190 mutante kopijen/ μL 80 keer werd verdund

Bovenstaande conditie (Tabel 22) heeft een FA van gemiddeld 0.35%. Dit stemt overeen met 2 mutante kopijen/ μL .

4.2.2.2 Vergelijking p.V299L-gBlock met patiënten-DNA

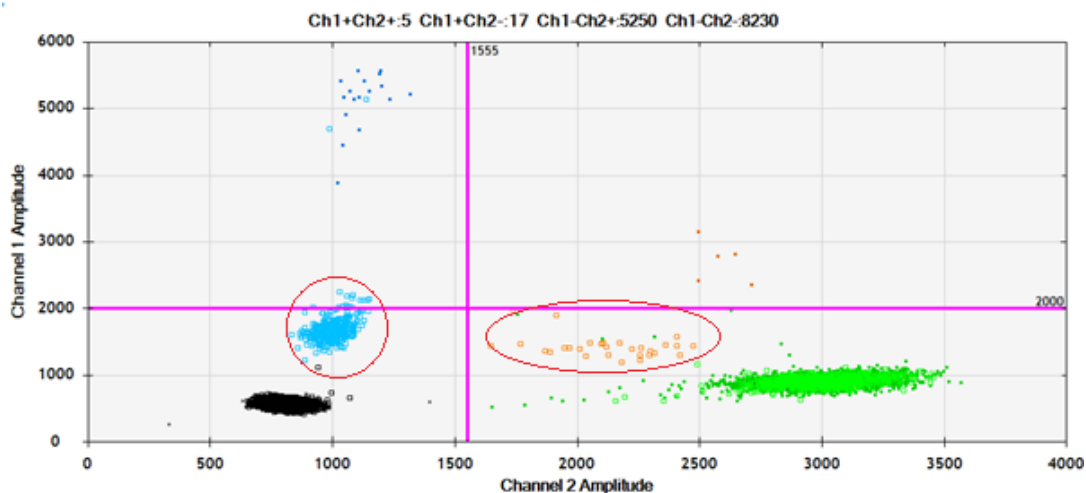
De patiëntenstalen, positief voor de p.V299L-mutatie, die gebruikt werden tijdens de optimalisatie van het p.V299L-assay (zie §4.1.1), zijn afkomstig van gefixeerde of ingevroren cellen. In Figuur 49 wordt een vergelijking gemaakt tussen de ligging van de clusters van de p.V299L-gBlock wanneer gebruik gemaakt wordt van de huidige annealingtemperatuur (55°) en de gevonden optimale annealingtemperatuur (52.5°C). De thresholds worden ingesteld op Ch1-Ch2: 1850-1555.



Figuur 49: Vergelijking clusters p.V299L-gBlock bij verschillende annealingtemperaturen: A) 52.5°C en B) 55°C

Bij het gebruik van de p.V299L-gBlock, als positieve controle, blijkt geen verschil waarneembaar tussen de vier clusters wanneer de test uitgevoerd wordt bij een annealingtemperatuur van 52.5°C (A) of 55°C (B). Bovendien worden de vier clusters bij beide annealingtemperaturen goed gescheiden. Enkel de fluorescentiegraad is gestegen bij een verlaagde annealingtemperatuur (single-FAM-positief en single-HEX-positief), dit is opnieuw te wijten aan een specifieke PCR-reactie. De primers en probes kunnen gemakkelijker binden waardoor de kans op hybridisatie met specifieke fragmenten groter wordt. De thresholds blijven behouden bij beide annealingtemperaturen, de FA van de p.V299L-gBlock blijft hetzelfde en bedraagt 0.3%.

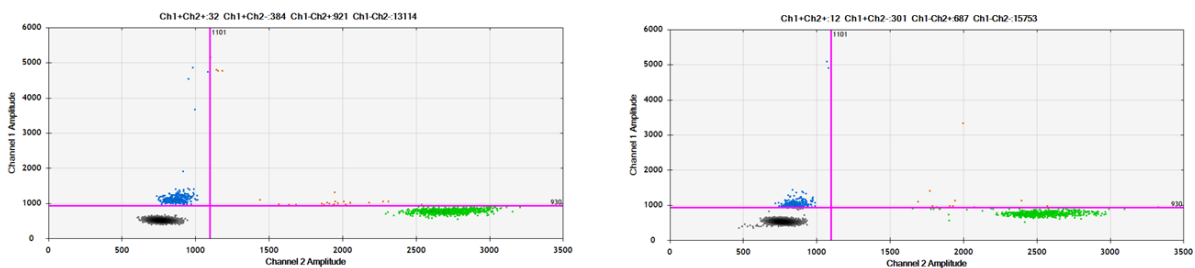
In Figuur 50 worden de clusters van het p.V299L-patiëntenstaal en de p.V299L-gBlock met elkaar vergeleken.



Figuur 50: Vergelijking clusters van p.V299L-gBlock met p.V299L-patiëntenstaal SR (omcirkeld in het rood)

De clusters van het p.V299L-positieve patiëntenstaal (omcirkeld in rood), gebruikt tijdens de optimalisatie, zijn zeer sterk afwijkend wanneer vergeleken wordt met de clusters afkomstig van de p.V299L-gBlock. Hier wordt duidelijk opgemerkt dat de single-FAM-positieve (blauw) en HEX/FAM-positieve (oranje) druppels veel lager gelegen zijn bij het SR-patiëntenstaal dan bij de p.V299L-gBlock. Dit wijst op een slechte hybridisatie van de primer en probes ten gevolge van onzuiverheden aanwezig in het DNA-staal wat resulteert in een verstoring van de ddPCR-reactie en bijgevolg de fluorescentiegraad. In §4.1.1.1 werd de concentratie van DNA-input van dit patiëntenstaal al verlaagd om zo ook de concentratie aan contaminanten te verlagen. Dit leverde geen bevredigende resultaten op.

Omdat geen ander materiaal ter beschikking is van de p.V299L-positieve patiënten, wordt geopteerd om het huidige DNA-staal (SR) op te zuiveren met een *Wizard*-procedure⁴. Vervolgens wordt dit opgezuiverde DNA getest in een nieuwe ddPCR-analyse, weergegeven in Figuur 51.



Figuur 51: Vergelijking SR-patiëntenstaal voor en na Wizard-procedure met: links SR-patiëntenstaal (10 ng/μL) voor Wizard en rechts SR-patiëntenstaal (10 ng/μL) na Wizard

Uit Figuur 51 blijkt duidelijk dat de Wizard-procedure geen invloed heeft uitgeoefend op de ligging van de clusterwolken. De vier kwadranten blijven moeilijk van elkaar te onderscheiden. De single-FAM-positieve en FAM/HEX-positieve druppels hebben nog steeds eenzelfde fluorescentiegraad als voordien. Een mogelijke hypothese voor de verstoring van de fluorescentiegraad is de aanwezigheid van een te gefragmenteerd DNA-staal of secundaire structuren die de primers en probes hinderen in hun hybridisatie.

4.2.2.3 Algemeen besluit p.V299L-gBlock

Er wordt een p.V299L-gBlock-verdunning in DLD-1 en TE-buffer aangemaakt met gemiddeld 2 mutante kopijen/μL en een FA gelegen rond 0.5%.

Hoewel het aantal verdunningsstappen werd vermeerderd, om de kans op een verdunningsfout te beperken, was het werkelijk aantal mutante kopijen/μL nog steeds sterk afwijkend van de theoretisch berekende waarden. Dit kan opnieuw te wijten zijn aan nog te grote verdunningsstappen die gemaakt worden waarbij niet-significante verdunningsfouten sterk worden uitvergroot. Voor de volgende gBlock-verdunningen zal daarom onmiddellijk proefondervindelijk bepaald worden wat het effectief aantal mutante kopijen/μL is voor een

⁴ Voor de werkwijze van de wizard wordt verwezen naar Bijlage H

bepaalde tussenverdunding in de verdunningsreeks vooraleer een conditie van 5 mutante kopijen/ μ L aangemaakt zal worden.

Door de ligging van de clusters van de positieve patiënten te vergelijken met de clusters afkomstig van de p.V299L-gBlock, kan vastgesteld worden dat de positieve patiëntenstalen niet representatief zijn. Bovendien kan de positie van de vier clusterwolken van de p.V299L-gBlock betrouwbaar worden geacht omdat geen significant verschil waarneembaar is tussen de positie van de clusterwolken van de andere gBlocks en hun respectievelijk positieve patiëntencontrole (zie verder §4.2.3). Bij het p.V299L-assay kan dit niet vergeleken worden omdat geen andere positieve patiëntenstalen ter beschikking zijn en omdat de Wizard geen invloed heeft uitgeoefend op de clusterscheiding.

4.2.3 Validatie overige ABL1-gBlocks

4.2.3.1 Resultaten

Voor de overige gBlocks (p.Q252H, p.Y253H, p.E255K, p.T315I en p.F317L) wordt een conditie bereid, vertrekkende van de theoretische $2.17 \cdot 10^4$ mutante kopijen/ μ L-tussenverdunding zoals weergegeven in Tabel 23 .

De reeds gevalideerde thresholds worden hierbij aangehouden en als volgt ingesteld:

- p.Q252H (Ch1-Ch2): 1545-1626;
- p.Y253H (Ch1-Ch2): 1060-1550;
- p.E255K (Ch1-Ch2): 2170-1500;
- p.T315I (Ch1-Ch2): 4013-2300;
- p.F317L (Ch1-Ch2): 1859-1856.

Tabel 23: Bereiding overige vijf conditie voor bepaling aantal mutante kopijen/ μ L in $2.17 \cdot 10^4$ -tussenverdunding

Conditie (Verwachting: ~ 1085 mutante kopijen/ μ L)	9.3 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 1 μ L $2.17 \cdot 10^4$ mutante kopijen/ μ L-gBlock 9.7 μ L TE (pH = 8.5)
---	---

Om de conditie te bereiden wordt de $2.17 \cdot 10^4$ -tussenverdunding twintig keer verdund in DLD-1 en TE-buffer. Hierbij worden theoretisch 1085 mutante kopijen/ μ L verwacht voor elke afzonderlijke gBlock-conditie.

Tabel 24 geeft het aantal verkregen mutante kopijen/ μ L weer voor de verschillende gBlock-condities die bereid werden volgens Tabel 23. Om een FA te bekomen van ongeveer 0.5% wordt voor elke gBlock een verdunningsfactor bepaald.

Tabel 24: Resultaten overige vijf gBlock-condities met berekende verdunningsfactor

Assay	Mutante kopijen/ μ L (conditie)	Werkelijk aantal mutante kopijen voor de $2.17 \cdot 10^4$ -verdunning (x20)	FA	Verdunningsfactor (FA \sim 0.5%)
p.Q252H	16.5	330	2.1%	4
p.Y253H	20	405	3.0%	6
p.E255K	12.6	252	2.1%	4
p.T315I	15.2	304	2.5%	5
p.F317L	21.8	436	3.2%	6.4

Er kan besloten worden dat de $2.17 \cdot 10^4$ -tussenverdunning voor de p.Q252H-, p.Y253H-, p.E255K-, p.T315I- en p.F317L-gBlock respectievelijk 330, 405, 252, 304 en 436 mutante kopijen/ μ L bevat. Dit is gemiddeld 65 keer minder dan de verwachte $2.17 \cdot 10^4$ mutante kopijen/ μ L.

Met behulp van de berekende verdunningsfactor in Tabel 24, worden nieuwe gBlock-condities aangemaakt zoals weergegeven in Tabel 25.

Tabel 25: Bereiding overige vijf condities met een FA \sim 0.5%

Conditie p.Q252H (Verwachting: FA \sim 0.5%)	37 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 1 μ L 330 mutante kopijen/ μ L-gBlock 42 μ L TE-buffer pH = 8.5
Conditie p.Y253H (Verwachting: FA \sim 0.5%)	37 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 0.7 μ L 405 mutante kopijen/ μ L-gBlock 42.3 μ L TE-buffer pH = 8.5
Conditie p.E255K (Verwachting: FA \sim 0.5%)	37 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 1 μ L 252 mutante kopijen/ μ L-gBlock 42 μ L TE-buffer pH = 8.5
Conditie p.T315I (Verwachting: FA \sim 0.5%)	37 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 0.8 μ L 304 mutante kopijen/ μ L-gBlock 42.2 μ L TE-buffer pH = 8.5
Conditie p.F317L (Verwachting: FA \sim 0.5%)	37 μ L DLD-1 (216 ng/ μ L) 0.7 μ L 436 mutante kopijen/ μ L-gBlock 42.3 μ L TE-buffer pH = 8.5

In onderstaande Tabel 26 worden de bekomen FA-waardes weergegeven samen met het aantal verkregen mutante kopijen/ μ L.

Tabel 26: Resultaten overige vijf gBlock-condities

Assay	Mutante kopijen/ μ L (conditie)	FA
p.Q252H	2.8	0.44%
p.Y253H	2.6	0.45%
p.E255K	2.5	0.38%
p.T315I	3	0.44%
p.F317L	3.5	0.52%

Alle condities hebben een FA gelegen in de buurt van de 0.5%.

4.2.3.2 Algemeen besluit overige ABL1-gBlocks

Voor de overige vijf gBlocks wordt een conditie in DLD-1 en TE-buffer aangemaakt met gemiddeld 2 à 3 mutante kopijen/ μ L en een FA gelegen rond 0.5%. Door eerst het effectief aantal mutante kopijen/ μ l te bepalen van de aangemaakte $2.17 \cdot 10^4$ -gBlock-verdunningen, werd onmiddellijk de juiste conditie, met een FA~0.5%, aangemaakt voor de verschillende mutanten.

Elk van de zeven verschillende singleplex gBlocks wordt vijf keer meegenomen in een ddPCR-analyse. Aan de hand van deze individuele meetpunten kan een controlegrafiek worden opgesteld en kan de gemiddelde FA, de boven- en ondergrens worden bepaald. Deze grafieken worden weergegeven in Bijlage E.

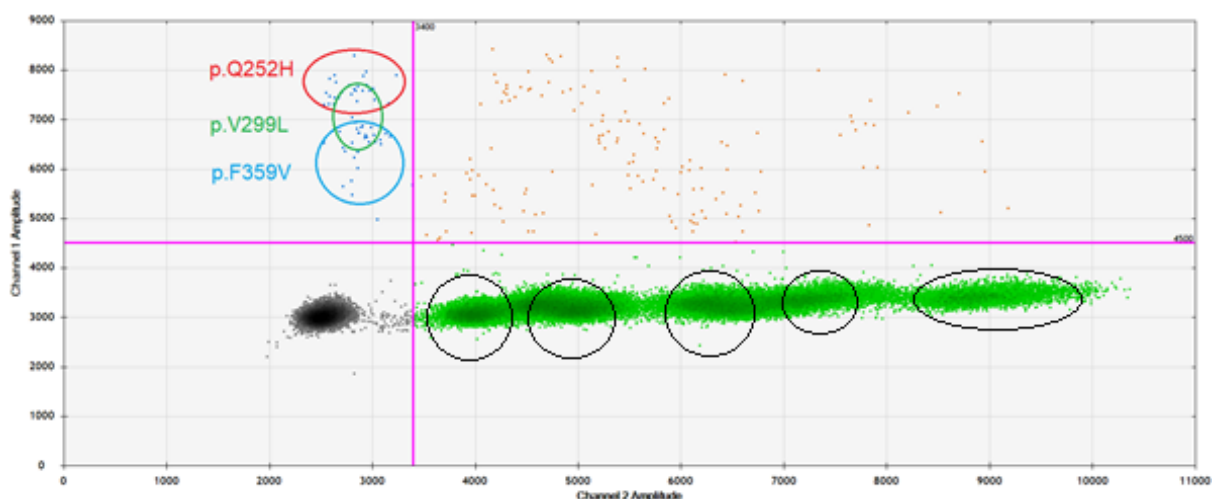
4.3 Multiplexen

4.3.1 Multiplexen primer/probe-assay in reactiemix

Zoals eerder vermeld (§3.2.6), bevat multiplex-reactiemix A assays voor drie verschillende mutaties: p.Q252H, p.V299L en p.F359V. De p.Y253H- en p.T315I-assays worden gepooled in multiplex-reactiemix B. In multiplex-reactiemix C worden de p.E255K- en p.F317L-assays samengebracht. De multiplex-reactiemixen worden getest aan de hand van DLD-1, water en de 0.5% singleplex gBlock als positieve controle van de aparte assays in de multiplex. In de 2D-plots wordt de *overlay* van de 0.5% gBlocks afkomstig van de aparte assays in de multiplex weergegeven.

4.3.1.1 Multiplex-reactiemix A

Voor multiplex-reactiemix A worden de thresholds ingesteld op Ch1-Ch2: 4500-3400 zoals weergegeven in onderstaande Figuur 52.



Figuur 52: Resultaat multiplex-reactiemix A (overlay van 0.5% singleplex gBlocks) met: 5 single-HEX-positieve wolken (zwart omcirkeld), grote variatie in HEX/FAM-positieve wolken door kruisreactie, 3 single-FAM-positieve wolken (rood p.Q252H-gBlock, groen p.V299L-gBlock en blauw p.F359V-gBlock)

Er worden vier kwadranten onderscheiden. De zwarte puntenwolk zijn de lege druppels (zonder mutant of wildtype DNA). Er worden vijf single-HEX-positieve wolken (groen) waargenomen waaronder: de eerste drie (uiterst links) afkomstig van de drie verschillende assays (p.Q252H, p.V299L en p.F359V), de andere twee wolken (uiterst rechts) zijn afkomstig van super-HEX-fragmenten die gevormd worden. Deze super-HEX-fragmenten zijn waarschijnlijk afkomstig van een kruisreactie die plaatsvindt tussen de verschillende assays. Hierbij kan een forward primer van het ene assay een extra fragment vormen met een reverse primer van het andere assay. Op deze extra fragmenten kunnen beide HEX-gelabelde probes, van de verschillende assays, binden. Welke combinatiemogelijkheden precies optreden kan hier niet met zekerheid worden vastgelegd.

Er worden single-FAM-positieve wolken (blauw) waargenomen afkomstig van de drie verschillende singleplex gBlocks (FA~0.5%). De p.Q252H-assay situeert zich rond de 7000-8000 Ch1-amplitude (bovenaan) en de p.F359V-assay is eerder gelegen tussen de 6000-7000 (onderaan) Ch1-amplitude. De p.V299L-assay bevindt zich hiertussen. Hieruit kan besloten worden dat de afzonderlijke positieve controles moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn omdat de p.V299L-singleplex gBlock zich tussen de twee andere singleplex gBlocks bevindt.

Er wordt een vergelijking gemaakt tussen de singleplexen en de multiplex-reactiemix wat betreft: de FA (Tabel 27) en het aantal single-FAM-positieve druppels zoals weergegeven in Tabel 28.

Tabel 27: Vergelijking FA voor singleplex en multiplex-reactiemix A

gBlock	FA in singleplex	FA in multiplex
p.Q252H	0.42%	0.15%
p.V299L	0.36%	0.11%
p.F359V	0.72%	0.22%

Tabel 28: Vergelijking aantal single-FAM-druppels in singleplex-reactie en multiplex-reactiemix A

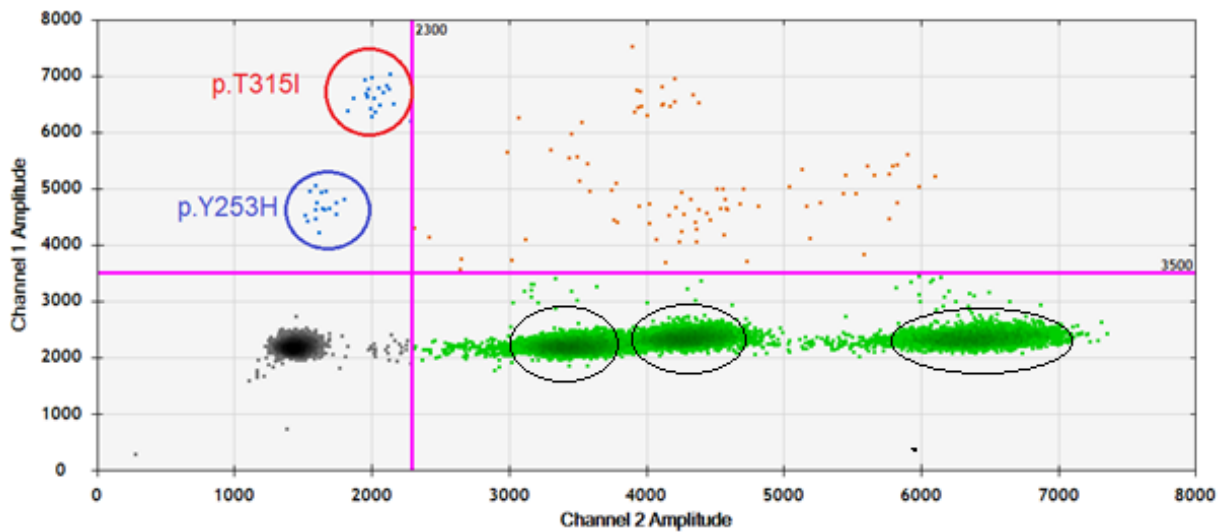
Multiplex-reactiemix A	Gemiddeld aantal druppels single-FAM-positief singleplex	Gemiddeld aantal druppels single-FAM-positief multiplex
p.Q252H-gBlock	19	10
p.V299L-gBlock	14	10
p.F359V-gBlock	35	17

De FA van de afzonderlijke singleplex gBlocks binnen de multiplex-reactiemix A zijn gedaald zoals weergegeven in Tabel 27. Deze daling is deels te wijten aan een reductie van het aantal single-FAM-positieve druppels in de multiplex ten opzichte van deze in de afzonderlijke singleplex-reactie zoals weergegeven in Tabel 28. Een daling van het aantal FAM-positieve druppels kan toegeschreven worden aan een minder specifieke ddPCR-reactie omdat gebruik gemaakt wordt van drie verschillende primer/probe-assays in de reactiemix, hierdoor kan competitie optreden ten gevolge van kruisreacties (zie verder bij oranje druppels).

De oranje druppels bevatten zowel HEX-, FAM- als super-HEX-fragmenten. In tegenstelling tot een singleplex-assay zijn nu diverse wolken zichtbaar afkomstig van de kruisreactie tussen de verschillende assays. Zo kan bijvoorbeeld een wildtype fragment van het ene assay een FAM-probe van het andere assay dragen en visa versa. Hierdoor ontstaan ook HEX/FAM-druppels. Deze verschillende fragmenten kunnen gecombineerd aanwezig zijn in de HEX/FAM-druppels, wat de grote verscheidenheid aan oranje druppels verklaart.

4.3.1.2 Multiplex-reactiemix B

Voor de multiplex-reactiemix B worden de thresholds ingesteld op Ch1-Ch2: 3500-2300 zoals weergegeven in Figuur 53.



Figuur 53: Resultaat multiplex-reactiemix B (overlay van 0.5% singleplex gBlocks) met: 3 single-HEX-positieve wolken (zwart omcirkeld), 2 single-FAM-positieve wolken (rood p.T315I-gBlock en blauw p.Y253H-gBlock) en grote variatie aan HEX/FAM-positieve wolken

Er zijn opnieuw vier grote groepen van druppels aanwezig. De zwarte puntenwolk wijst op de lege druppels. Er zijn drie single-HEX-positieve wolken: één afkomstig van de p.Y253H-assay, een andere van de p.T315I-assay en een laatste wolk (meest rechtse) is afkomstig van een combinatie van beide assays (super-HEX). Deze super-HEX wolk ontstaat waarschijnlijk doordat de forward primer van de p.Y253H een fragment kan vormen met de reverse primer van de p.T315I-assay. Aan dit fragment kunnen de HEX-gelabelde wildtype probes van beide assays binden waardoor de graad van fluorescentie stijgt en deze groene wolk opschuift naar rechts.

De twee blauwe wolken bevatten de single-FAM-positieve druppels afkomstig van respectievelijk de p.Y253H-assay (gelegen tussen de 4000 en 5000 Ch1-amplitude) en de p.T315I-assay (gelegen tussen de 6000 en 7000 Ch1-amplitude). De singleplex gBlocks kunnen duidelijk afzonderlijk waargenomen worden.

Er wordt opnieuw een vergelijking gemaakt tussen de singleplexen en de multiplex-reactiemix wat betreft: de FA (Tabel 29) en het aantal single-FAM-positieve druppels (zie Tabel 30).

Tabel 29: Vergelijking FA voor singleplex en multiplex-reactiemix B

gBlock	FA in singleplex	FA in multiplex
p.Y253H	0.53%	0.28%
p.T315I	0.47%	0.24%

Tabel 30: Vergelijking aantal single-FAM-druppels in singleplex-reactie en multiplex-reactiemix B

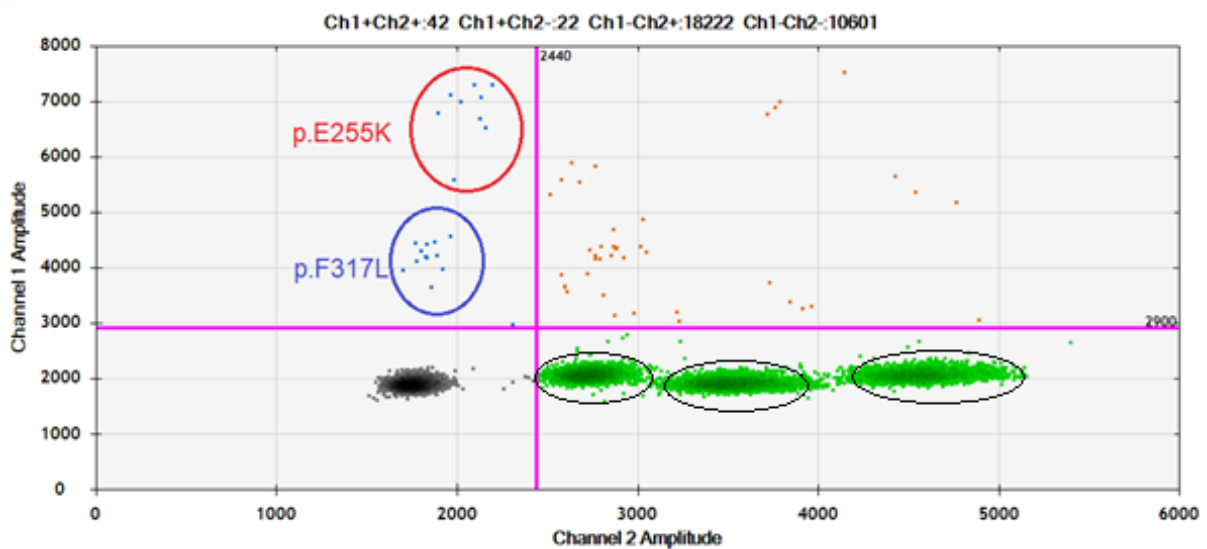
Multiplex-reactiemix B	Gemiddeld aantal druppels single-FAM-positief singleplex	Gemiddeld aantal druppels single-FAM-positief multiplex
p.Y253H-gBlock	18	10
p.T315I-gBlock	22	11

Wanneer de FA vergeleken wordt tussen de singleplex en de multiplex, van elke afzonderlijke singleplex gBlock, kan opnieuw waargenomen worden dat de FA gedaald is (zie Tabel 29) door een daling in single-FAM-positieve druppels (Tabel 30). Opnieuw zorgt competitie tussen de verschillende assays voor een daling van het aantal single-FAM-positieve druppels.

De oranje druppels bevatten zowel een FAM-, HEX- als super-HEX-fragmenten. Zoals eerder werd vermeld, vindt een kruisreactie plaats tussen de verschillende assays waarbij een FAM-probe van het ene assay kan hybridiseren met wildtype DNA van een ander assay en visa versa. Dit resulteert in een grote diversiteit van de oranje druppels.

4.3.1.3 Multiplex-reactiemix C

Een analoog resultaat wordt verkregen bij de multiplex-reactiemix C (Figuur 54). De thresholds worden ingesteld op Ch1-Ch2: 2900-2440.



Figuur 54: Resultaat multiplex-reactiemix C met: 3 single-HEX-positieve wolken (zwart omcirkeld), 2 single-FAM-positieve wolken (rood p.E255K-gBlock en blauw p.F317L-gBlock) en grote variatie aan HEX/FAM-positieve wolken

Er zijn drie single-HEX-positieve wolken: één afkomstig van de p.E255K-assay, een andere van de p.F317L-assay en een laatste afkomstig van een combinatie van de twee assays waarbij de forward primer van de p.E255K extra fragmenten vormt met de reverse primer van de p.F317L, waaraan de HEX-gelabelde wildtype probes van beide assays kunnen binden.

De twee blauwe wolken zijn afkomstig van de p.E255K- en p.F317L-assay. De p.E255K-assay wordt waargenomen tussen de 6000 en 7000 Ch1-amplitude en de p.F317L-assay is gelegen rond de 4000-5000 Ch1-amplitude. Uit Figuur 54 kan besloten worden dat de singleplex gBlocks van de twee verschillende assays afzonderlijk waargenomen kunnen worden.

Tabel 31 en Tabel 32 geeft een vergelijking weer van respectievelijk: de FA, aantal single-FAM-positieve druppels en de positie van de single-FAM-positieve druppels.

Tabel 31: Vergelijking FA voor singleplex en multiplex-reactiemix C

gBlock	FA in singleplex	FA in multiplex
p.E255K	0.44%	0.18%
p.F317L	0.56%	0.28%

Tabel 32: Vergelijking aantal single-FAM-druppels in singleplex-reactie en multiplex-reactiemix C

Multiplex-reactiemix C	Gemiddeld aantal druppels single-FAM-positief singleplex	Gemiddeld aantal druppels single-FAM-positief multiplex
p.E255K-gBlock	19	9
p.F317L-gBlock	26	13

Ook hier is de FA gereduceerd zoals weergegeven in Tabel 31, mogelijk door een daling van het aantal single-FAM-positieve druppels in de multiplex-reactiemix (zie Tabel 32). Dit is opnieuw te wijten aan competitie tussen de verschillende assays.

De dubbelpositieve druppels (HEX/FAM) kunnen opnieuw een FAM-, een HEX- als een super-HEX-fragment bevatten door het optreden van een kruisreactie tussen de verschillende assays.

4.3.1.4 Algemeen besluit multiplexen primer/probe-assay

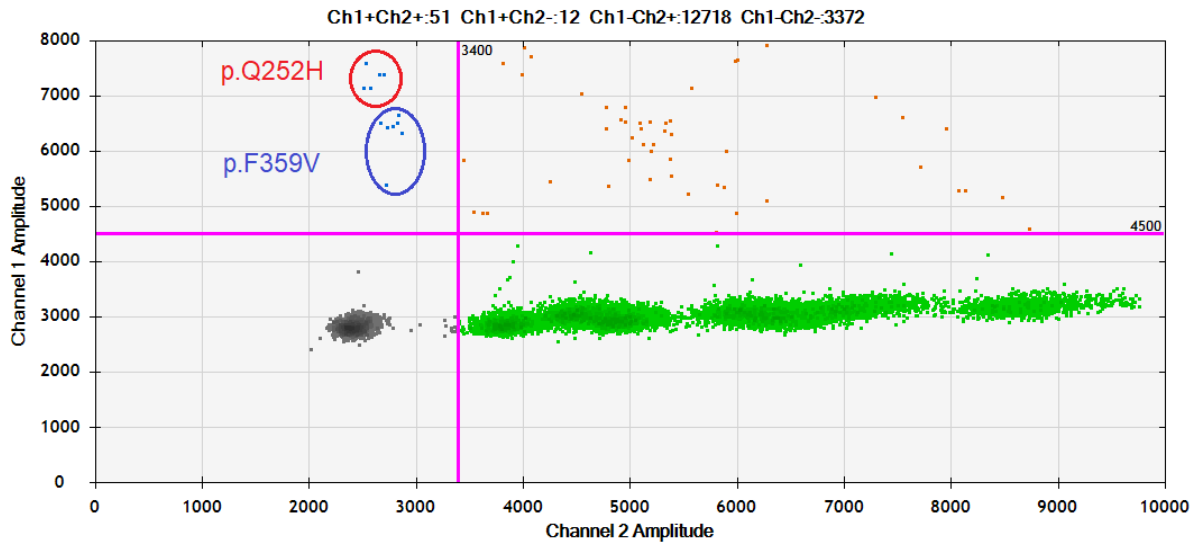
De positieve controles (0.5% singleplex gBlocks) zijn nog steeds detecteerbaar maar de FA-waarde is gedaald. Deze daling is te wijten aan een lager aantal single-FAM-positieve druppels in de multiplex vergeleken met deze in de singleplex. De reductie van het aantal single-FAM-positieve druppels kan verklaard worden doordat gebruikt gemaakt wordt van meerdere primer/probe-assays in de reactiemix die aanleiding geven tot competitie.

4.3.2 Multiplexen gBlocks

Vervolgens wordt getest of gewerkt kan worden met een gBlock-multiplex (gBlock-mix) voor elke multiplex-reactiemix. Dit kan het aantal wells, gebruikt voor de positieve controles, aanzienlijk verlagen. Voor de analyse worden dezelfde thresholds aangehouden die in §4.3.1 werden vastgelegd. In de 2D-plots worden de gBlock-mixen in de multiplex-reactiemix weergegeven.

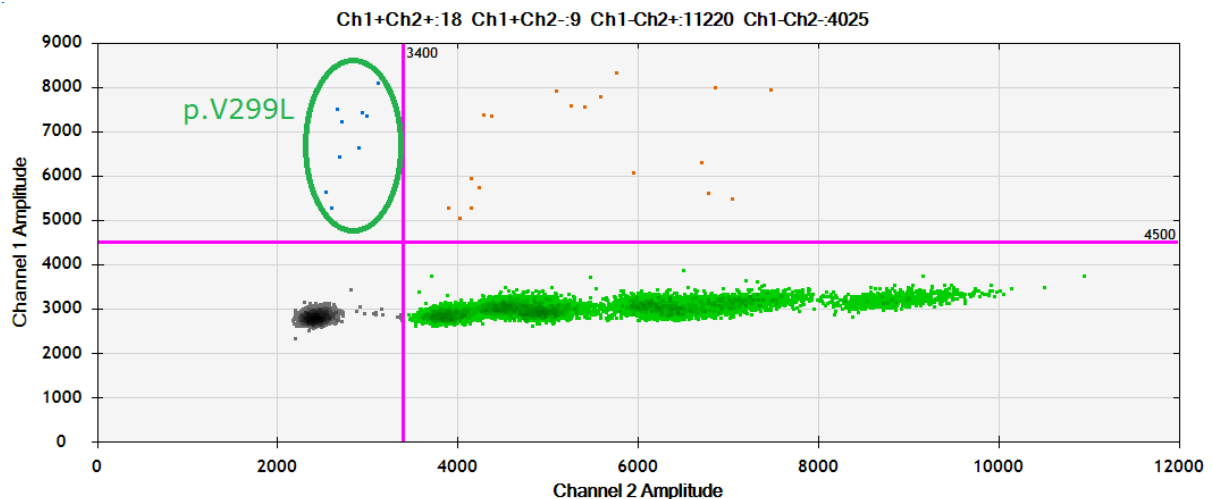
4.3.2.1 gBlock-mix A

Aangezien de single-FAM-positieve druppels van het p.V299L-assay moeilijk te onderscheiden zijn van de overige twee assays in multiplex-reactiemix A (zie §4.3.1.1), wordt beslist om deze niet op te nemen in de gBlock-mix A, zoals weergegeven in Figuur 55 en Figuur 56.



Figuur 55: Resultaat gBlock-mix A in multiplex-reactiemix A vertoont 2 afzonderlijke single-FAM-positieve wolken afkomstig van de p.Q252H (rood)- en p.F359V (blauw)-gBlock in de gBlock-mix A

Door gebruik te maken van een gBlock-mix voor multiplex-reactiemix A, zijn de single-FAM-positieve druppels, afkomstig van de p.Q252H (rood)- en p.F359V (blauw)-gBlock nog steeds duidelijk waarneembaar en bevinden deze zich op dezelfde positie als de singleplex gBlocks in de multiplex-reactiemix A. De FA voor de gBlock-mix A bedraagt 0.35%.

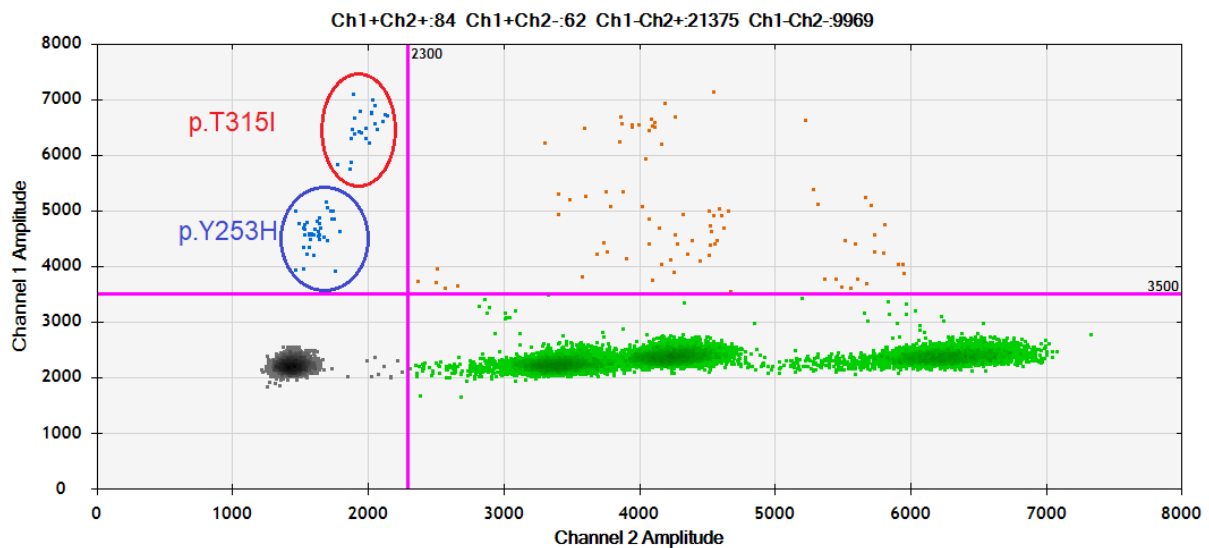


Figuur 56: Resultaat singleplex p.V299L-gBlock in multiplex-reactiemix A vertoont dezelfde single-FAM-positieve, single-HEX-positieve en dubbelpositieve wolken

De p.V299L-gBlock (groen) wordt, zoals eerder vermeld, apart meegenomen. Ook hier zijn de single-FAM-positieve druppels duidelijk waarneembaar en bedraagt de FA voor de p.V299L-singleplex gBlock 0.13%.

4.3.2.2 gBlock-mix B

Voor multiplex-reactiemix B levert de gBlock-mix B het verwachte resultaat op zoals weergegeven in Figuur 57.

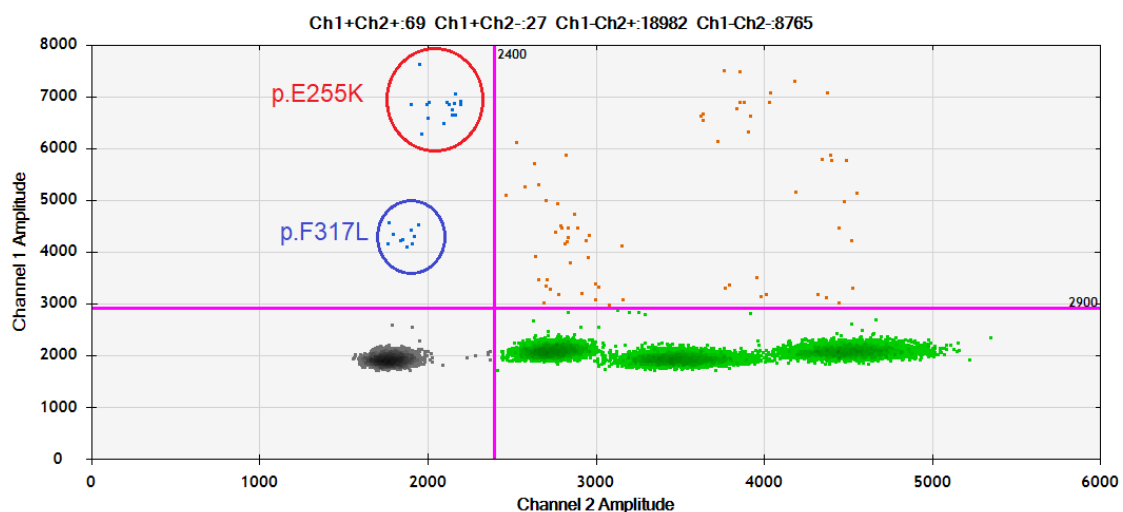


Figuur 57: Resultaat gBlock-mix B in multiplex-reactiemix B vertoont 2 afzonderlijke single-FAM-positieve wolken afkomstig van de p.T315I (rood)- en p.Y253H (blauw)-gBlock in de gBlock-mix B

De bovenste single-FAM-positieve wolk is afkomstig van de p.T315I-assay, de onderste van de p.Y253H-assay. Beide blauwe wolken bevinden zich op dezelfde positie als bij de singleplex gBlocks in de multiplex-reactiemix en zijn duidelijk te onderscheiden. De FA van de gBlock-mix B bedraagt 0.40%.

4.3.2.3 gBlock-mix C

Naar analogie met de twee voorgaande gBlock-mixen komt ook voor de gBlock-mix C het resultaat overeen met de singleplex gBlocks zoals weergegeven in Figuur 58.



Figuur 58: Resultaat gBlock-mix C in multiplex-reactiemix C vertoont 2 afzonderlijke single-FAM-positieve wolken afkomstig van de p.E255K- (rood) en p.F317L- (blauw) gBlock in de gBlock-mix C

De single-FAM positieve druppels liggen op dezelfde positie en zijn duidelijk gescheiden (Figuur 58). De FA van de gBlock-mix C bedraagt 0.30%.

4.3.2.4 Algemeen besluit multiplexen gBlocks

Uit de voorgaande testen, uitgevoerd met de gBlock-mixen, kan besloten worden dat deze PC's nog steeds duidelijk waarneembaar zijn. De FA van de gBlock-mix in de multiplex-reactiemix is gestegen ten opzichte van de FA van de singleplex gBlocks in de multiplex-reactiemix zoals weergegeven in Tabel 33.

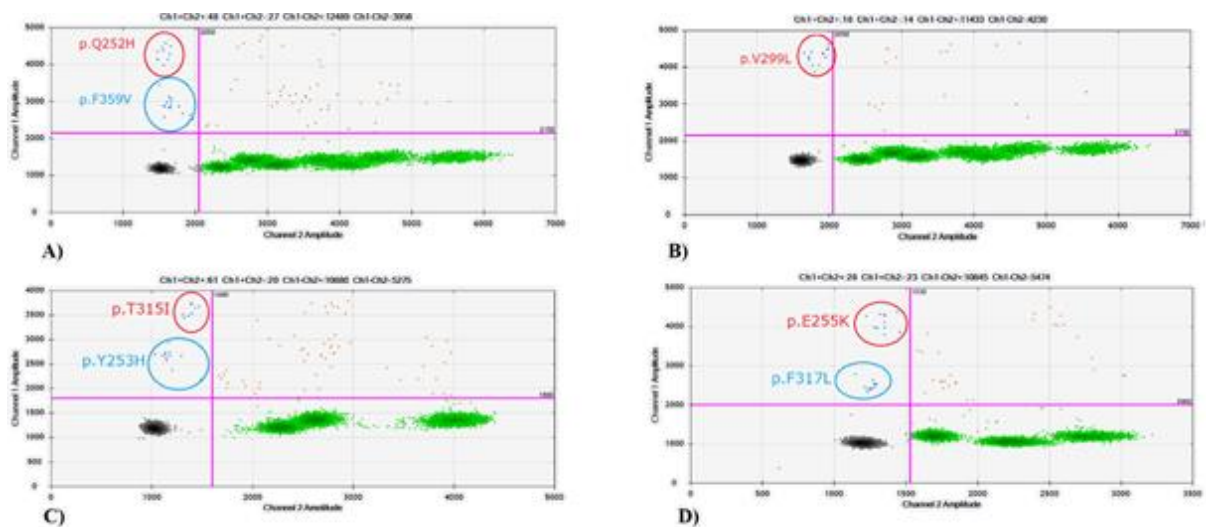
Tabel 33: Vergelijking FA voor gBlock-mix en singleplex gBlocks in multiplex-reactiemix

	FA gBlock-mix in multiplex-reactiemix	FA singleplex gBlock in multiplex-reactiemix
Multiplex A: p.Q252H p.V299L p.F359V	0.35%	0.15% 0.11% 0.22%
Multiplex B: p.Y253H p.T315I	0.40%	0.28% 0.24%
Multiplex C p.E255K p.F317L	0.30%	0.18% 0.28%

In de gBlock-mixen zijn twee assays aanwezig, aan eenzelfde hoeveelheid waarmee de afzonderlijke singleplex gBlocks werden aangemaakt. Dit resulteert in een verhoogd aantal mutante kopijen/ μ L afkomstig van gBlock-mix en dus bijgevolg een verhoogde FA.

4.3.3 Reductie hoeveelheid primer/probe-assay in reactiemix

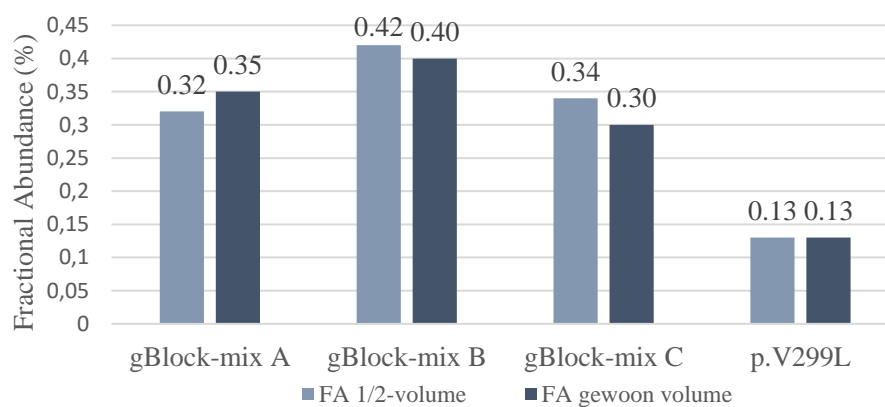
Om de kosten van de ddPCR-analyse verder te drukken, wordt nagegaan of met halve volumes aan primer/probe-assay gewerkt kan worden. Door gebruik te maken van halve volumes aan assay moeten de thresholds, die bepaald werden in §4.3.1 worden aangepast (Ch1-Ch2): 2150-2050 voor multiplex-reactiemix A, 1800-1600 voor multiplex-reactiemix B en 2000-1530 voor multiplex-reactiemix C. In de 2D-plots worden de gBlock-mixen in de multiplex-reactiemix, met het gereduceerde volume, weergegeven (zie Figuur 59).



Figuur 59: Positie clusterwolken bij 1/2-volume primer/probe-assay: A) gBlock-mix A in multiplex-reactiemix A, B) singleplex p.V299L in multiplex-reactiemix A, C) gBlock-mix B in multiplex-reactiemix B en D) gBlock-mix C in multiplex-reactiemix C

Met deze aangepaste thresholds worden dezelfde wolken waargenomen die in §4.3.1 werden besproken. Deze wolken bevinden zich lager en hebben dus een lager fluorescentiegehalte. De verminderde fluorescentie is het rechtstreeks gevolg van de verminderde hoeveelheid aan assay. De single-FAM-positieve druppels blijven nog steeds duidelijk onderscheidbaar en waarneembaar.

In Figuur 60 wordt de FA vergeleken tussen het gewone volume en het gehalveerde volume aan primer/probe-assay.



Figuur 60: Vergelijking FA voor gewoon en gereduceerd volume aan primer/probe-assay

De FA-waarde voor de gBlock-mixen met halve volumes assay bedraagt gemiddeld 0.32% voor gBlock-mix A in multiplex-reactiemix A, 0.13% voor de singleplex p.V299L-gBlock in multiplex-reactiemix A, 0.42% voor gBlock-mix B in multiplex-reactiemix B en 0.34% voor gBlock-mix C in multiplex-reactiemix C. Dit komt ongeveer overeen met de FA zonder volumereductie van de assays zoals weergegeven wordt in Figuur 60.

Voordat de multiplex-reacties toegepast mogen worden in routine, worden vijf ddPCR-analyses herhaald om zo een controlegrafiek te kunnen opstellen, dit wordt weergegeven in Bijlage G. Uitgaande hiervan kan een gemiddelde FA bepaald worden.

4.3.4 Algemeen besluit multiplex

Er werden drie multiplex-reactiemixen aangemaakt en getest. Voor elke multiplex zijn de PC's duidelijk waarneembaar. Door gebruik te maken van een multiplex-reactiemix daalt de FA-waarde van de gebruikte positieve controles (gBlocks), dit heeft weinig impact op de interpretatie van het resultaat omdat de PC's nog steeds betrouwbaar gedetecteerd worden. In routine gaan de multiplexen enkel gebruikt worden voor een eerste snelle screening van de zeven mogelijke ABL1-puntmutaties. Wanneer een patiëntenstaal positief test voor één van de drie multiplexen, dan volgt een accurate kwantificatie met de singleplex-assay.

Voor elke multiplex-reactiemix kan gebruik gemaakt worden van een overeenkomstige gBlock-mix. Voor multiplex-reactiemix A wordt de p.V299L-gBlock apart meegenomen omdat deze moeilijk te onderscheiden is van de overige twee assays.

Door gebruik te maken van halve volumes primer/probe-assay in de multiplex-reactiemix wordt de prijs per reactie gehalveerd. De PC's zijn nog steeds duidelijk waarneembaar en de FA-waarde is gelijkaardig gebleven aan de bekomen resultaten met het normaal volume aan primer/probe-assay (mits gebruik van aangepaste thresholds).

5 Besluit

Uit de optimalisatie van de p.V299L-assay is gebleken dat deze mutatie opgespoord kan worden met het droplet digitale PCR-protocol dat gebruikt wordt voor de zes andere, reeds gevalideerde, ABL1-assays. Dus meer specifiek kan gebruik gemaakt worden van restrictie-enzym MseI, DNA-input 100 ng/ μ L en het huidige temperatuurprogramma met een annealingtemperatuur van 55°C. De methode levert juiste resultaten op vergeleken met de huidige routinetesten, eerstelijnscontroles en derdelijnscontrole. De resultaten zijn reproduceerbaar en de methode is robuust.

De gBlocks, dienende als vervanging van positieve patiëntencontroles, kunnen geïmplementeerd worden in de routine diagnostiek. De gBlock-condities worden aangemaakt in TE-buffer en DLD-1 (tot een eindconcentratie van 100 ng/ μ L). In een eerste stap wordt het aantal mutante kopijen/ μ L van een tussenverdunding bepaald. Van hieruit worden dan condities aangemaakt met een FA van ongeveer 0.5%.

Voor de drie aangemaakte multiplex-reactiemixen (A, B en C) zijn de singleplex gBlocks als positieve controle nog duidelijk waarneembaar maar daalt de FA-waarde. Om het aantal controle-wells te verminderen, worden gBlock-mixen aangemaakt. Ook hier blijven de positieve controles duidelijk waarneembaar. Door gebruik te maken van halve volumes aan primer/probe-assay binnen de multiplex-reactiemix, wordt de kost gereduceerd voor elke ddPCR-reactie. De FA-waarde is gelijkaardig gebleven met de bekomen resultaten voor het normaal volume aan primer/probe-assay binnen de multiplex-reactiemix.

Literatuurlijst

- [1] M. Meyers, *Voorstelling onderwerpen masterproef biochemie*, Diepenbeek, 2017.
- [2] C. De Benedittis, S. Soverinin, C. Papayannidis, S. Paolini en a. et, „Drug resistance and BCR-ABL kinase domain mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia from the imatinib to the second-generation tyrosine kinase inhibitor era,” *Cancer* 120, vol. 120, nr. 7, pp. 1002-1009, 2014.
- [3] R. Kurzrock, H. M. Kantarjian, B. J. Druker en M. Talpaz, „Philadelphia chromosome-positive leukemias: From basic mechanisms to molecular therapeutics,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 138, nr. 10, pp. 819-830, 2003.
- [4] A. Q. Shen, N. M. Wilson, S. L. Gleason en H. J. Khoury, „Bosutinib in the treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) chronic myelogenous leukemia: an overview,” *Therapeutic Advances in Hematology*, vol. 5, nr. 1, pp. 13-17, 2014.
- [5] d. J. Janssen, d. J. Cornelissen, p. d. J. Falkenburg en e. al, „Guidelines for the treatment of chronic myeloid leukemia in the year 2014,” *Nederlands tijdschrift voor hematologie*, vol. 11, nr. 5, p. 14, 2014.
- [6] T. Heather, „Tips for working with gBlocks Gene Fragments,” Integrated DNA technologies, 25 April 2017. [Online]. Available: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/tips-for-working-with-gblocks-gene-fragments>. [Geopend 17 Februari 2018].
- [7] Bio-Rad, „Rare mutation detection best practices guidelines,” [Online]. Available: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6628.pdf. [Geopend 3 Maart 2018].
- [8] B. Zhang, C.-W. Xu en Y.-F. Huai-Tao, „Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation,” *Experimental and therapeutic Medicine*, vol. 9, nr. 4, pp. 1383-1388, 2015.
- [9] J. Kuby en J. T. Kindt, „Cells,” in *Kuby*, W.H.Freeman & Co Ltd, Osborne, 2013, p. 603.
- [10] J. Vardiman, J. Thiele, D. Arber, R. Brunning, M. Borowitz, A. Porwit, N. Harris, M. Le Beau, E. Hellström-Lindberg, A. Tefferi en C. Bloomfield, „The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes,” *Blood*, vol. 114, nr. 5, pp. 937-951, 2009.
- [11] D. C. Ludwig, „Leukemia,” *Medsurg Nursing; Pitman*, vol. 18, nr. 3, pp. 190-194, 2009.
- [12] S. Ahmad, N. Tandon, N. Tiwari en e. al, „Frequency of Different Types of Leukemia in Bone Marrow- Study at a Tertiary Care Center, Lucknow,” *British Journal of Medicine & Medical Research*, vol. 17, nr. 10, pp. 1-7, 2016.
- [13] H. Lodisch, Z. Xun, G. Saghi en S. K. Peter, „Structure of BCR-ABL oncoprotein oligomerization domain,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 9, nr. 2, pp. 117-120, 2012.

- [14] D. S. Goodsell, „The Molecular Perspective: c-Abl Tyrosine Kinase,” *The Oncologist*, vol. 10, nr. 9, pp. 758-759, 2005.
- [15] S. Hanks, A. Quinn en T. Hunter, „The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains,” *Science*, vol. 241, pp. 45-52, 1988.
- [16] G. Morgan, „The role of alternative splicing patterns of BCR/ABL transcripts in the generation of the blast crisis of chronic myeloid leukemia,” *British Journal of haematology*, nr. 76, pp. 33-38, 1990.
- [17] M. Sattlermc en J. D.Griffin, ABC of Clinical Haematology, vol. 40, Londen: BMJ Books, 2003, pp. 4-10.
- [18] R. J. Mc.Whirter, L. D. Galasso en J. Y.J. Wang, „A Coiled-Coil Oligomerization Domain of Bcr Is Essential for the Transforming Function of Bcr-Abl Oncoproteins,” *Molecular and cellular biology*, vol. 13, nr. 12, pp. 7587-7595, 1993.
- [19] H. Kantarjian, „Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies,” *American society of hematology*, 2000.
- [20] H. S. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris en E. S. Jaffe, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.
- [21] „Diagram showing the cell that ALL starts in.,” Cancer Research UK, UK, 2013.
- [22] P. M. Ching-Hon en W. E. Evans, „Acute lymphoblastic leukemia,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 9, nr. 339, pp. 605-615, 1998.
- [23] J. Cortes en K. Hagop, „Chronic Myeloid Leukemia,” *Hematology, Oncology and Palliative Medicine*, pp. 1-9, 4 maart 2015.
- [24] C. L. Sawyers, „Chronic myeloid leukemia,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 340, nr. 17, pp. 1330-1340, 1999.
- [25] S. Winter, „Pre-B acute lymphoblastic leukemia with b3a2 and e1a2 BCR-ABL fusion transcripts relapsing as chronic myelogenous leukemia with a less differentiated b3a2 clone,” *Leukemia*, pp. 2007-2011, 1999.
- [26] B. Liu , W. Zhang en H. Ma, „Complete cytogenetic response to Nilotinib in a chronic myeloid leukemia case with a rare e13a3(b2a3) BCR-ABL fusion transcript: A case report,” *Molecular Medicine Reports*, vol. 13, nr. 3, pp. 2635-2638, 2016.
- [27] B. Kajtar en et.al, „Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei,” *International Society for Analytical Cytology*, vol. Part A, nr. 69, pp. 506-514, 2006.
- [28] F. Bushra, M. F. Bassam en H. Y. Rusul, „Evaluation of Electrolytes Disturbances in Iraqi Chronic Myeloid Leukemia Patients treated with Nilotinib with Monitoring of Response by FISH Study,” *Baghdad Science Journal*, vol. 12, nr. 1, pp. 110-118, 2015.
- [29] N. Cross, J. Melo, L. Feng en et.al, „An optimized multiplex polymerase chain reaction for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders,” *Leukemia*, vol. 8, nr. 1, pp. 186-186, 1994.

- [30] H. Bower en et.al, „Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 34, nr. 24, pp. 2851-2857, 2016.
- [31] Q. A. Shen, M. N. Wilson, L. S. Gleason en J. H. Khoury, „Bosutinib in the treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) chronic myelogenous leukemia: an overview,” *Therapeutic Advances in Hematology*, pp. 13-17, 2014.
- [32] O. C. Database, *Tyrosine kinase inhibitors*, U.S.: U.S. National Library of Medicine.
- [33] P. Manley, J. Cowan, S. Buchdunger, E. Fabbro en et.al, „Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor,” *European Journal of Cancer*, pp. 19-27, 2002.
- [34] R. Capdeville, E. Buchdunger, J. Zimmermann en e. al, „Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, pp. 493-502, 2002.
- [35] M. Deininger, E. Buchdunger en B. J. Druker, „The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid,” *Blood*, vol. 105, nr. 7, pp. 2640-2653, 2005.
- [36] P. Manley, S. Cowan-Jacob en J. Mestan, „Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1754, nr. 1, pp. 3-13, 2005.
- [37] J. W. Janssen en p. d. J. Cornelissen, „Richtlijnen voor de behandeling van chronische myeloïde leukemie anno 2014,” *Ned Tijdschr Hematologie*, vol. 11, nr. 5, pp. 1-30, 2014.
- [38] A. Lankheet, J. Beijnen, J. Schellens en e. al, „Resistentie tegen tyrosinekinaseremmers,” *PW Wetenschappelijk Platform*, vol. 7, nr. 8, pp. 122-127, 2009.
- [39] X. An, A. Tiwari, Y. Sun, P. Ding, C. Ashby Jr en Z. Chen, „BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review,” *Leukemia research*, vol. 34, nr. 10, pp. 1255-1268, 2010.
- [40] W. Deenik en J. J. Cornelissen, „Resistentie tegen imatinib bij de behandeling van chronische myeloïde leukemie: mechanismen, het belang van adequate responsmonitoring en behandelingsmogelijkheden,” *Nederlands Tijdschrift voor Hematologie*, vol. 4, nr. 1, pp. 7-16, 2005.
- [41] S. Cowan-Jacob, S. Kaufman, J. Mestan, M. Wiesmann, R. Woodman en e. al, „Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 18, nr. 19, p. 6977-6986, 2010.
- [42] A. I. Daud en S. S. Krishnamurthi, „Phase I Study of Bosutinib, a Src/Abl Tyrosine Kinase Inhibitor, Administered to Patients with Advanced Solid Tumors,” *Clinical Cancer Research*, vol. 18, nr. 4, pp. 1092-1100, 2015.
- [43] B. Feret, „Ponatinib: An oral tyrosine kinase inhibitor for treatment of CML and Ph+ALL,” *North Olmsted*, vol. 48, nr. 5, pp. 169-170, 2013.
- [44] D. P. Vandenberghe en et.al, Nieuwe inzichten in de hematologie, UZ Leuven Gasthuisberg, 2017-2018.

- [45] P. Roels en H. Vranckx, „De polymerase-kettingreactie,” 2002. [Online]. Available: https://wet.kuleuven.be/wetenschapinbreedbeeld/lesmateriaal_biologie/lespakket2005/1lera_rentekst.pdf. [Geopend 24 Februari 2018].
- [46] M. Meyers, *Recombinante DNA-technologie*, Diepenbeek: UHasselt Xod, 2017-2018.
- [47] P. Elmer, „Chemagen,” 6 Juli 2012. [Online]. Available: http://www.chemagen.com/fileadmin/user_upload/Downloads/PDFs/Protocols/art_101_-_chemagic_DNA_Blood100_Kit_V120706.pdf. [Geopend 8 April 2018].
- [48] Biolabs, „MseI,” England, 2018.
- [49] B.-R. Laboratories, Auteur, *ddPCR Supermix for Probes*. [Performance]. Bio-Rad, 2018.
- [50] B. H. Hindson en K. D. Ness, „High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number,” *Analytical Chemistry*, vol. 83, nr. 1, pp. 8604-8610, 2011.
- [51] „Absolute Quantification of PCR Targets with the Droplet Digital™ PCR System,” *BIO-RAD*.
- [52] C. J. Mattocks, „A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests,” *European Journal of Human Genetics*, vol. 18, nr. 1, p. 1276–1288, 2010.
- [53] D. J. Klaessens, *Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium*, Utrecht: Syntax Media, 2013.
- [54] S. Soverini, A. Hochhaus en E. Franck, „BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet,” *Bloodjournal*, vol. 118, nr. 5, pp. 1208-1215, 2011.

Bijlagenlijst

BIJLAGE A: EIGENSCHAPPEN GELEVERDE GBLOCKS	101
BIJLAGE B: WERKBLAD ABL1-MUTATIEANALYSE MET DDPCR.....	105
BIJLAGE C: OVERZICHT TYPES TESTEN EN TE VALIDEREN PARAMETERS	107
BIJLAGE D: AANMAAK SINGLEPLEX GBLOCKS.....	109
BIJLAGE E: CONTROLEGRAFIEKEN SINGLEPLEX GBLOCKS	111
BIJLAGE F: WERKBLAD MULTIPLEX-REACTIEMIX ABL1-MUTATIEANALYSE AAN ½- VOLUME PRIMER/PROBE-ASSAY	119
BIJLAGE G: CONTROLEGRAFIEK GBLOCK-MIX IN ½-VOLUME PRIMER/PROBE-ASSAY ..	121
BIJLAGE H: WIZARD VOOR OPZUIVERING DNA-STAALE.....	125

Bijlage A: Eigenschappen geleverde gBlocks

ABL1-p.Q252H-gBlock

5' - AGG CTG TTC CCT GTT TCC TTC AGC TCT ACG TCT CCT CCG AGA GCC GCT TCA ACA CCC TGG CCG AGT
 TGG TTC ATC ATC ATT CAA CGG TGG CCG ACG GGC TCA TCA CCA CGC TCC ATT ATC CAG CCC CAA AGC GCA
 ACA AGC CCA CTG TCT ATG GTG TGT CCC CCA ACT ACG ACA AGT GGG AGA TGG AAC GCA CGG ACA TCA CCA
 TGA AGC ACA AGC TGG GCG GGG GCC ACT ACG GGG AGG TGT ACG AGG GCG TGT GGA AGA AAT ACA GCC TGA
 CGG TGG CCG TGA AGA CCT TGA AGG TAG GCT GGG ACT GCC GGG GGT GCC CAG GGT ACG TGG GGC AAG GCG
 TCT GCT GGC ATT AGG CGA TGC ATC TGC CTG GAA GTC TAC CTC CTG CCT . . . - 3'

Lengte (bp)	Geleverde hoeveelheid (ng)	Moleculair gewicht	fmoles/ng	µg/OD ₂₆₀
450	500	277967.9	3.60	50

ABL1-p.Y253H-gBlock

5' - GTC TCC TCC GAG AGC CGC TTC AAC ACC CTG GCC GAG TTG GTT CAT CAT CAT TCA ACG GTG GCC GAC
 GGG CTC ATC ACC ACG CTC CAT TAT CCA GCC CCA AAG CGC AAC AAG CCC ACT GTC TAT GGT GTG TCC CCC
 AAC TAC GAC AAG TGG GAG ATG GAA CGC ACG GAC ATC ACC ATG AAG CAC AAG CTG GGC GGG GGC CAG CAC
 GGG GAG GTG TAC GAG GGC GTG TGG AAG AAA TAC AGC CTG ACG GTG GCC GTG AAG ACC TTG AAG GTA GCG
 TGG GAC TGC CCG GGG TGC CCA GGG TAC GTG GGG CAA GGC GTC TGC TGG CAT TAG GCG ATG CAT CTG CCT
 GGA AGT CTA CCT CCT GCC TGC TGT CCG AGG GCT TCA TTG GCG CCA CGG . . . - 3'

Lengte (bp)	Geleverde hoeveelheid (ng)	Moleculair gewicht	fmoles/ng	µg/OD ₂₆₀
450	500	277964.9	3.60	50

ABL1-p.E255K-gBlock

5' - TTT CCT TCA GCT CTA CGT CTC CTC CGA GAG CCG CTT CAA CAC CCT GGC CGA GTT GGT TCA TCA TCA
 TTC AAC GGT GGC CGA CGG GCT CAT CAC CAC GCT CCA TTA TCC AGC CCC AAA GCG CAA CAA GCC CAC TGT
 CTA TGG TGT GTC CCC CAA CTA CGA CAA GTG GGA GAT GGA ACG CAC GGA CAT CAC CAT GAA GCA CAA GCT
 GGG CCG GGG CCA GTA CCG GAA GGT GTA CGA GGG CGT GTG GAA GAA ATA CAG CCT GAC GGT GGC CGT GAA
 GAC CTT GAA GGT AGG CTG GGA CTG CCG GGG GTG CCC AGG GTA CGT GGG GCA AGG CGT CTG CTG GCA TTA
 GGC GAT GCA TCT GCC TGG AAG TCT ACC TCC TGC CTG CTG TCC GAG GGC . . . - 3'

Lengte (bp)	Geleverde hoeveelheid (ng)	Moleculair gewicht	fmoles/ng	µg/OD ₂₆₀
450	500	277964.9	3.60	50

ABL1-p.V299L-gBlock

5' - TCA TGG AAC CTG TCT GCA GCA ATG TGG CTG TCA CAA AAC GCA GCC CAG GAC GAG TAT GCG CTG AAG
 CTC CAT TTT GCA TTA ACT AGT CAA GTA CTT ACC CAC TGA AAA GCA CTT CCT GAA ATA ATT TCA CCT TCG
 TTT TTT TCC TTC TGC AGG AGG ACA CCA TGG AGG TGG AAG AGT TCT TGA AAG AAG CTG CAG TCA TGA AAG
 AGA TCA AAC ACC CTA ACC TGC TGC AGC TCC TTG GTG AGT AAG CCC GGG GCT CTG AAG AGA GGG TCT CGC
 GCC GCA CCC CCA GGG TGA CAC AGG CGC TGG GGA AGA CGC ACG GGC GGC TCA CTG CAC AAA ACC TCG TTG
 GAA TAT TTG TGC TCT GCC GAC GTT CAG CCG CGG GTA AAA TGA GGC CTG . . . - 3'

Lengte (bp)	Geleverde hoeveelheid (ng)	Moleculair gewicht	fmoles/ng	µg/OD ₂₆₀
450	500	277939.3	3.60	50

ABL1-p.T315I-gBlock

5' - AAA AGA GCC TGG CCA TGT CCC TCC CAC ACG AGC ACA GTC TCA GGA TGC AGG TGC TTG GGA CCA TGT
 TGG AAG TTG GGC CCA GGA CTG AGG AGC AGA GTC AGA ATC CTT CAG AAG GCT TTT TCT TTA GAC AGT TGT
 TTG TTC AGT TGG GAG CGG AGC CAC GTG TTG AAG TCC TCG TTG TCT TGT TGG CAG GGG TCT GCA CCC GGG
 AGC CCC CGT TCT ATA TCA TCA TTG AGT TCA TGA CCT ACG GGA ACC TCC TGG ACT ACC TGA GGG AGT GCA
 ACC GGC AGG AGG TGA ACG CCG TGG TGC TGC TGT ACA TGG CCA CTC AGA TCT CGT CAG CCA TGG AGT ACC
 TGG AGA AGA AAA ACT TCA TCC ACA GGT AGG GGC CTG GCC AGG CAG CCT . . . - 3'

Lengte (bp)	Geleverde hoeveelheid (ng)	Moleculair gewicht	fmoles/ng	µg/OD ₂₆₀
450	500	277960.0	3.60	50

ABL1-p.F317L-gBlock

5' - CCT GGC CAT GTC CCT CCC ACA CGA GCA CAG TCT CAG GAT GCA GGT GCT TGG GAC CAT GTT GGA AGT
 TGG GCC CAG GAC TGA GGA GCA GAG TCA GAA TCC TTC AGA AGG CTT TTT CTT TAG ACA GTT GTT TGT TCA
 GTT GGG AGC GGA GCC ACG TGT TGA AGT CCT CGT TGT CTT GTT GGC AGG GGT CTG CAC CCG GGA GCC CCC
 GTT CTA TAT CAT CAC TGA GTT GAT GAC CTA CGG GAA CCT CCT GGA CTA CCT GAG GGA GTG CAA CCG GCA
 GGA GGT GAA CGC CGT GGT GCT GCT GTA CAT GGC CAC TCA GAT CTC GTC AGC CAT GGA GTA CCT GGA GAA
 GAA AAA CTT CAT CCA CAG GTA GGG GCC TGG CCA GGC AGC CTG CGC CAT . . . - 3'

Lengte (bp)	Geleverde hoeveelheid (ng)	Moleculair gewicht	fmoles/ng	µg/OD ₂₆₀
450	500	277963.0	3.60	50

ABL1-p.F359V-gBlock

5' - CAC GTG TTG AAG TCC TCG TTG TCT TGT TGG CAG GGG TCT GCA CCC GGG AGC CCC CGT TCT ATA TCA
TCA CTG AGT TCA TGA CCT ACG GGA ACC TCC TGG ACT ACC TGA GGG AGT GCA ACC GGC AGG AGG TGA ACG
CCG TGG TGC TGC TGT ACA TGG CCA CTC AGA TCT CGT CAG CCA TGG AGT ACC TGG AGA AGA AAA ACG TCA
TCC ACA GGT AGG GGC CTG GCC AGG CAG CCT GCG CCA TGG AGT CAC AGG GCG TGG AGC CGG GCA GCC TTT
TAC AAA AAG CCC CAG CCT AGG AGG TCT CAG GGC GCA GCT TCT AAC CTC AGT GCT GGC AAC ACA TTG GAC
CTT GGA ACA AAG GCA AAC ACT AGG CTC CTG GCA AAG CCA GCT TTG GGC . . . - 3'

Lengte (bp)	Geleverde hoeveelheid (ng)	Moleculair gewicht	fmoles/ng	µg/OD ₂₆₀
450	500	277964.9	3.60	50

Bijlage B: Werkblad ABL1-mutatieanalyse met ddPCR



I. PCR:

Uitvoerder ddPCR:

Datum ddPCR:

I. VERDUNNEN VAN DE DNA STALEN:

verduin de stalen zoals aangegeven naast het staal

Lotnummer:

..... Nuclease vrij water

II. VERDUNNEN VAN HET RESTRICTIE ENZYME NAAR 2U/ μ l:

Lotnummer:

μ l/staal

Restrictie enzyme 0,2

Cutsmart Buffer 0,8

totaal 1

Restrictie enzym	Lotnummer RE	Lotnummer buffer
0		

III. REACTIEMIX AANMAKEN:

pipeteer (21 μ l X aantal herhalingen) mix per epje en voeg (1 μ l X aantal herhalingen) staal toe

Lotnummer:

μ l/staal

64084232 ddPCR Supermix for Probes 11

20x mut/WT primer/probe 1

restrictie enzyme 2U(verdund) 1

..... H₂O 8

totaal 21

Mix Nr	20x mut/WT primer/probe	Enzym	Lotnummer

pipeteer (21 μ l X aantal herhalingen) mix per epje en voeg (1 μ l X aantal herhalingen) staal toe

IV. Controles

test	Pos Controle 1	Pos controle 2	Neg controle

V. DROPLET GENERATIE, TRANSFER NAAR 96-WELL PLAAT EN SEALEN VAN DE PLAAT

Lotnummers:

64052952	Droplet Generation Oil
20161107	Droplet Generator DG8 Gasket
C000080069	DG8 Cartridge
100421	Pierceable Foil Heat Seal
64075307	ddPCR 96-Well Plates
64073815	2X ddPCR Buffer Control for Probes

VI. PCR:

Toestel:

Uur PCR:

Controle PCR-progr:

PCR-programma:

95°C - 10 min

ramp rate 2°C/sec

94°C - 30 sec

40 cycli

55°C - 1 min

98°C - 10 min

12°C - ∞

ramp rate 1°C/sec

Reactievolumen: 40 µl

Uitvoerder interpretatie:

Datum interpretatie:

Controle interpretatie:

Datum controle interpretatie:

Bijlage C: Overzicht types testen en te valideren parameters

	Description	Examples	Sensitivity ^a	Specificity ^b	Accuracy ^c	Trueness	Precision ^d	Limits of detection	Probability ^e
A	Quantitative tests. The result can have any value between two limits (including decimals).	Determination of methylation load (%); characterization of a mosaic mutation; heteroplasmy of mitochondrial variants.				++	++	++	
B	Categorical tests where the quantitative signal is placed into an ordinal series to give the final result.	Sizing a PCR product; determination of triplet repeat size (FRAXA, Huntington disease, etc.)			+	++	++	++	+
C	Categorical tests where the quantitative signal is placed into one of a limited series of predefined categories to give the final result.	Determination of copy number using PCR or MLPA.; exon deletion / duplication in <i>BRCA1</i> ; <i>PMP22</i> gene dosage in CMT and HINPP;			+	To establish correction factors and/or cut-offs			++
D	Qualitative tests where the true quantitative signal can have one of many possible values, but the required result can only have one of two possible values.	Mutation scanning for unknown mutations e.g. by sequencing or high resolution melt.	++	++	+	To establish correction factors and/or cut-offs		++ ^f	
E	Qualitative [binary] tests where the true quantitative signal can only have one of two possible values	Genotyping for a specific mutation e.g. <i>CFTR</i> Phe508del in cystic fibrosis or <i>HFE</i> Cys282Tyr in hemochromatosis.	++	++	+	To establish correction factors and/or cut-offs		++ ^f	+

Legend

	Metric used for implementation validation
	Metric used for implementation or ongoing validation
	Metric used for ongoing validation
	Recommended parameter
	Applicable parameter (less used)

Notes

- Sensitivity = True Positive / (True Positive + False Negative)
- Specificity = True Negative / (True Negative + False Positive)
- Accuracy = True Result / (True Result + False Result)
- Precision should be measured in terms of repeatability and intermediate precision (as well as reproducibility for inter-laboratory validations)
- The term 'probability' is used to describe situations where a probability that the result is correct can be assigned – primarily in on-going validation (e.g. competitive hypothesis testing)
- Should be used in tests where genotyping of low level variations is required for example mitochondrial DNA

Bijlage D: Aanmaak singleplex gBlocks

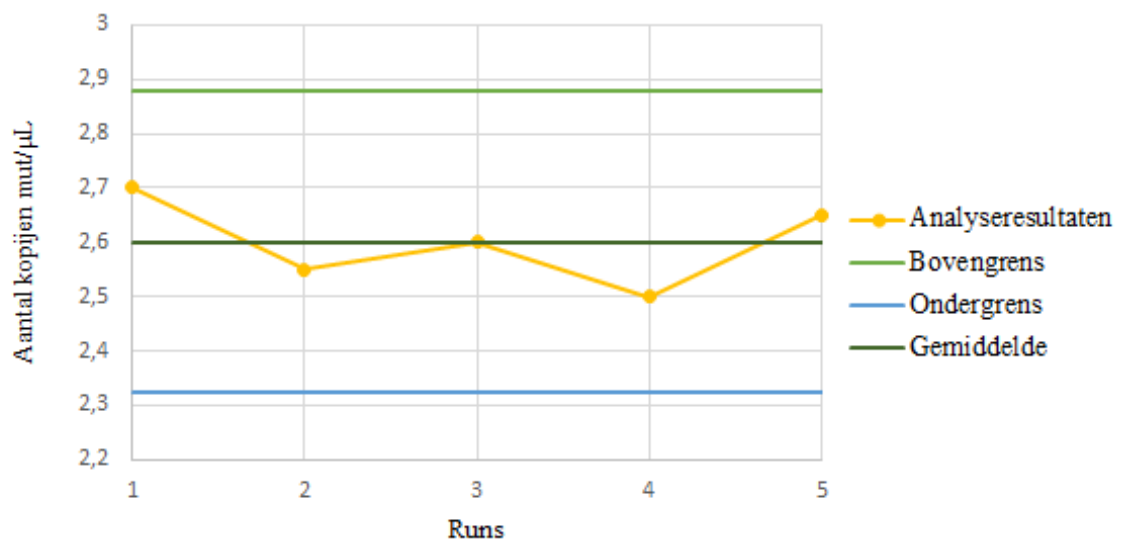
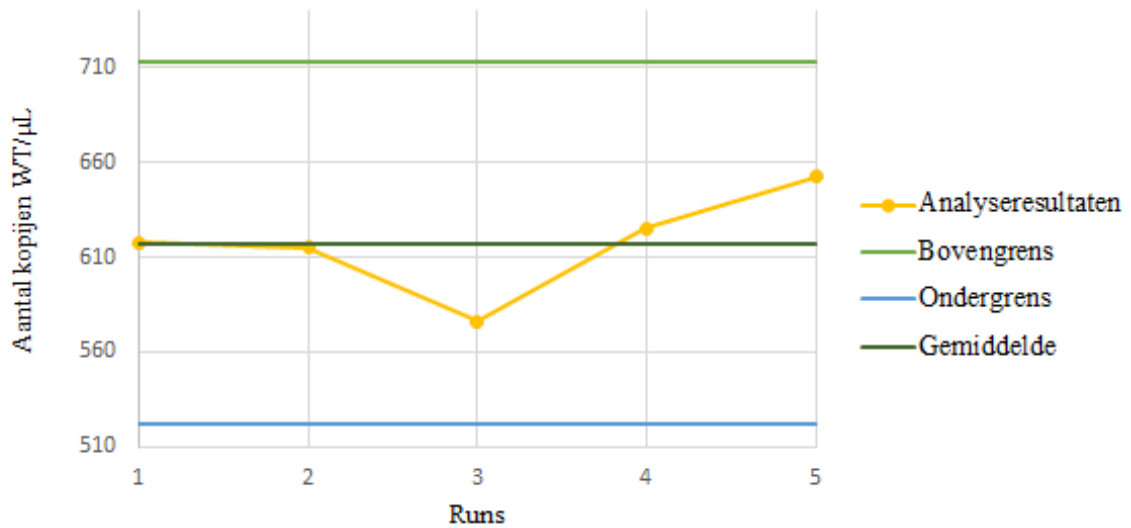
ABL1-gBlock	DLD-1 (216 ng/ μ L) (μ L)	gBlock	TE-buffer (pH 8.5) (μ L)	FA (%)
p.Q252H	37	1 μ L 320 mutante kopijen/ μ L- gBlock	42	0.42
p.Y253H	37	0.7 μ L 405 mutante kopijen/ μ L- gBlock	42.3	0.53
p.E255K	37	1 μ L 250 mutante kopijen/ μ L- gBlock	42	0.44
p.V299L	37	1 μ L 190 mutante kopijen/ μ L- gBlock	42	0.36
p.T315I	37	0.8 μ L 304 mutante kopijen/ μ L- gBlock	42.2	0.47
p.F317L	37	0.7 μ L 436 mutante kopijen/ μ L- gBlock	42.3	0.56
p.F359V	18.5	1 μ L 168 mutante kopijen/ μ L- gBlock	20.5	0.72

Bijlage E: Controlegrafieken singleplex gBlocks

p.Q252H-singleplex gBlock

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	618	521	714	2.7	2.3	2.9
2	615	521	714	2.6	2.3	2.9
3	576	521	714	2.6	2.3	2.9
4	626	521	714	2.5	2.3	2.9
5	653	521	714	2.7	2.3	2.9

Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle ⁵	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
617	27.5	96.1	OK	2.6	0.079	0.28	OK

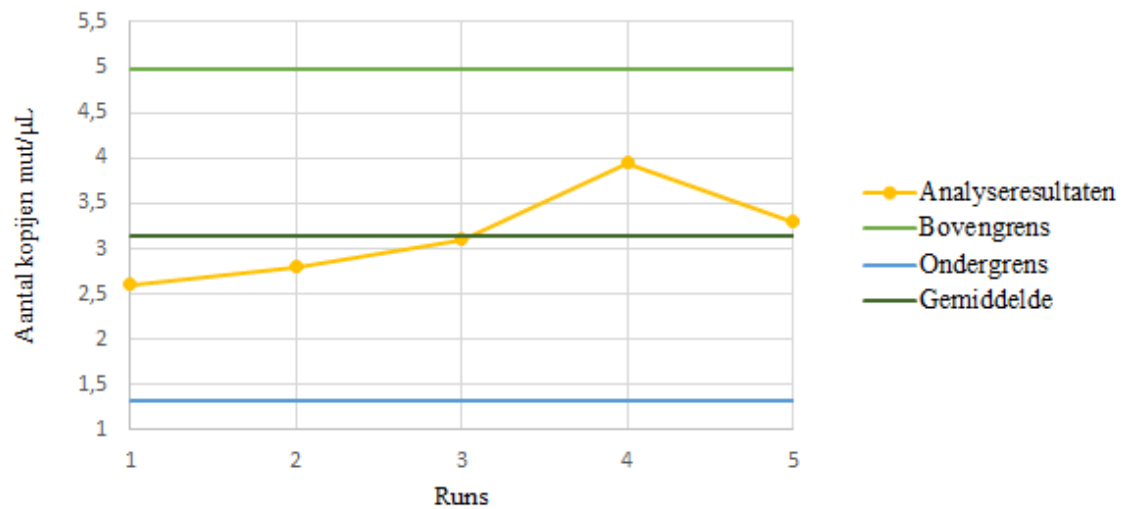
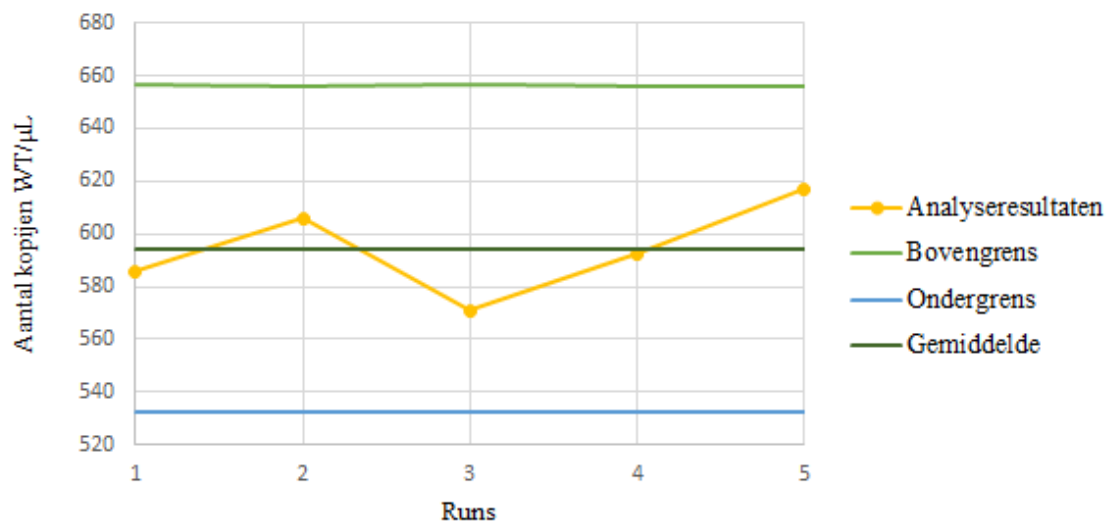


⁵ Controle: Indien gemiddelde $\geq 3.5 \cdot \text{stdev}$ dan is de controle in orde en moet geen zesde meetpunt getest worden

p.Y253H-singleplex gBlock

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	586	532	657	2.6	1.3	5.0
2	606	532	657	2.8	1.3	5.0
3	571	532	657	3.1	1.3	5.0
4	593	532	657	4.0	1.3	5.0
5	617	532	657	3.3	1.3	5.0

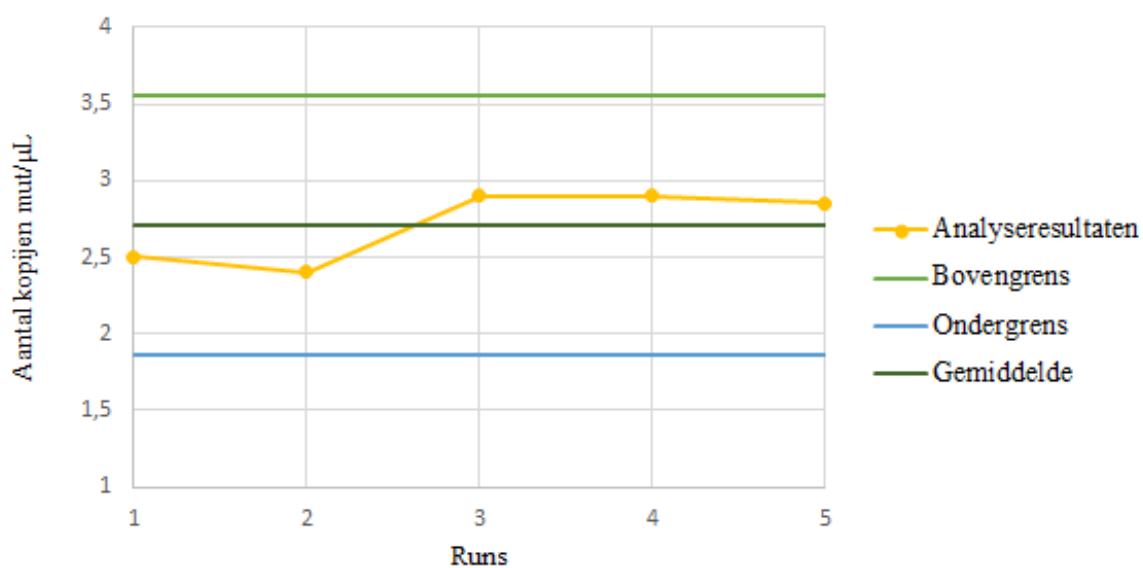
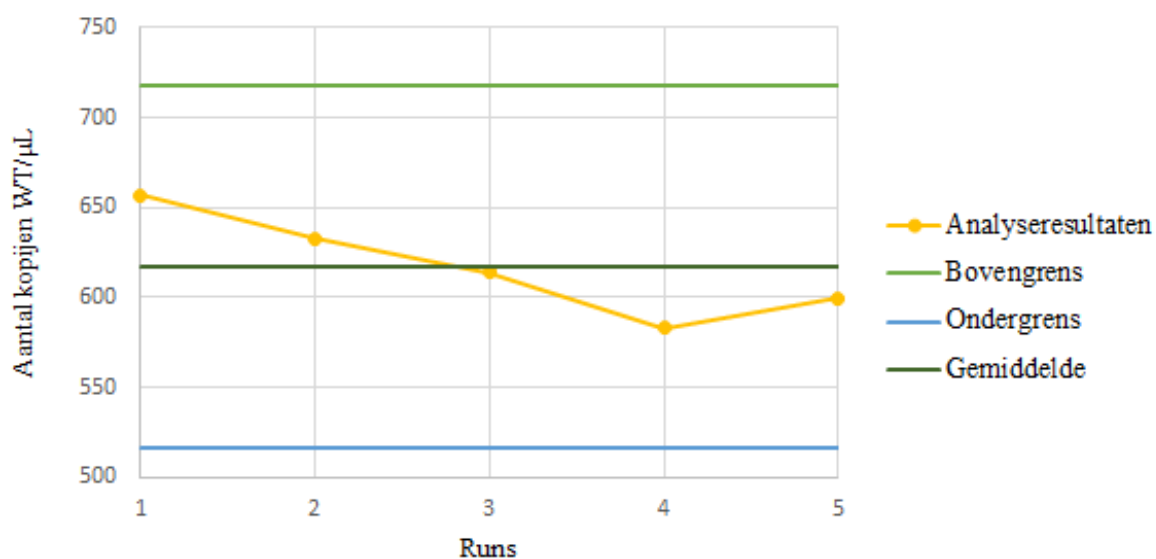
Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
594	17.8	62.3	OK	3.2	0.5	1.8	OK



p.E255K-singleplex gBlock

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	657	516	718	2.5	1.9	3.6
2	633	516	718	2.4	1.9	3.6
3	614	516	718	2.9	1.9	3.6
4	583	516	718	2.9	1.9	3.6
5	600	516	718	2.9	1.9	3.6

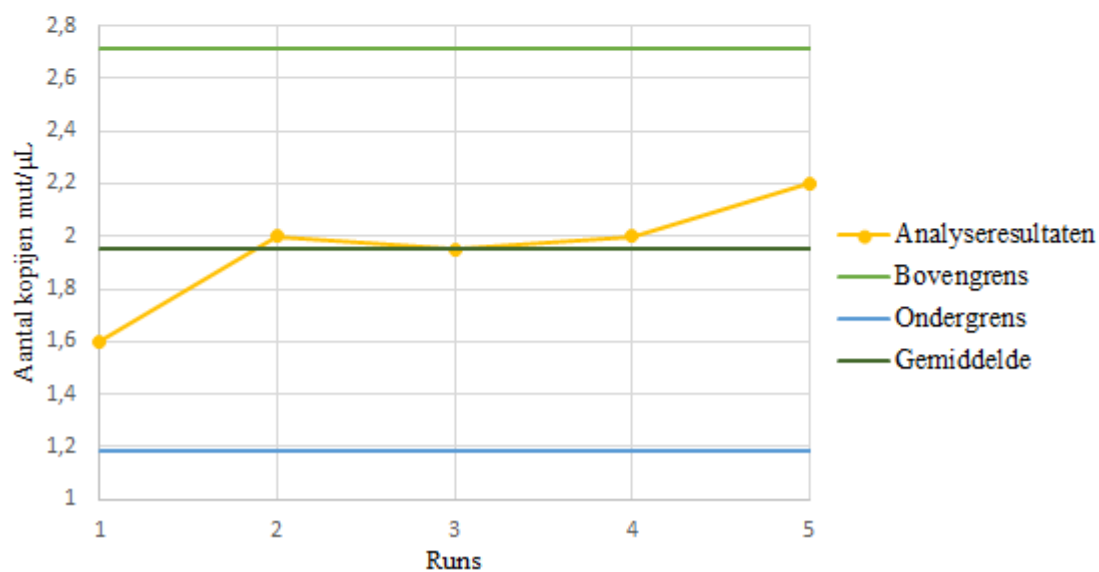
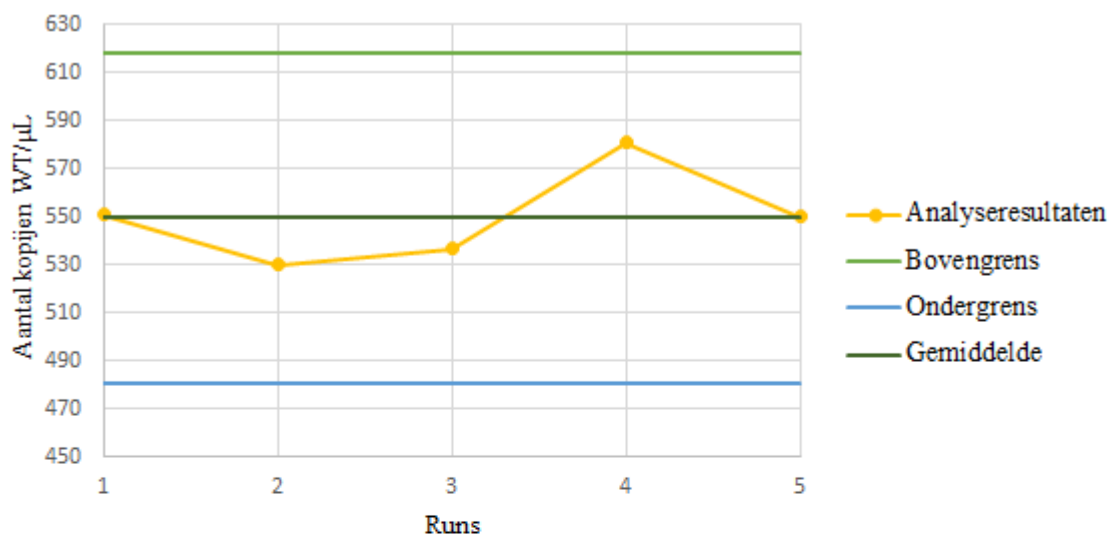
Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
617	28.8	101	OK	2.7	0.2	0.8	OK



p.V299L-singleplex gBlock

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	551	481	618	1.6	1.2	2.7
2	530	481	618	2.0	1.2	2.7
3	608	†	†	4.2	†	†
4	581	481	618	2.0	1.2	2.7
5	550	481	618	2.2	1.2	2.7
6	537	481	618	2.0	1.2	2.7

Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
564 ⁶	30.6	107	OK	2.4	1.0	3.6	NOK
550	19.6	68.8	OK	2.0	0.22	0.76	OK

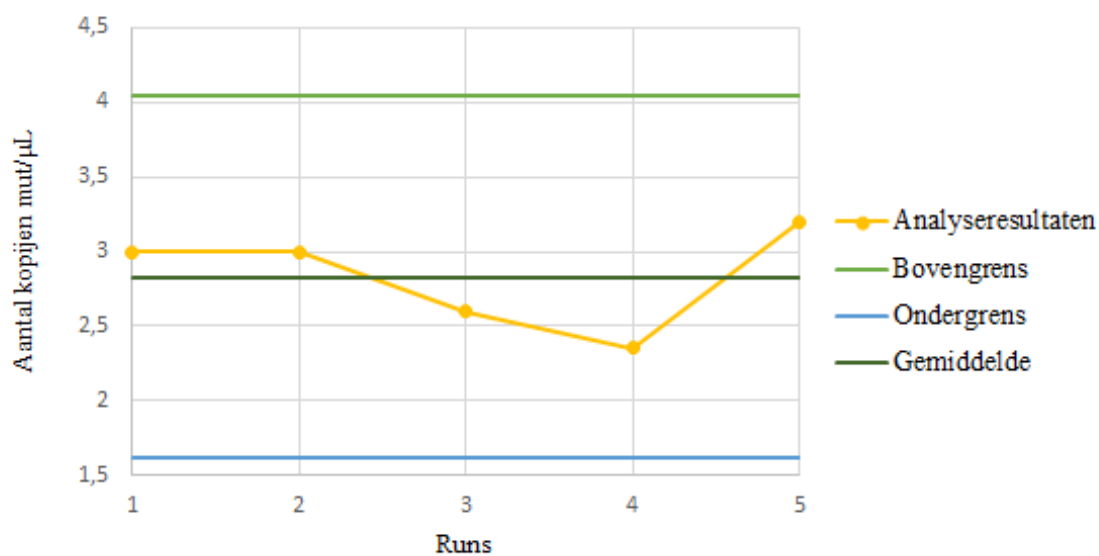
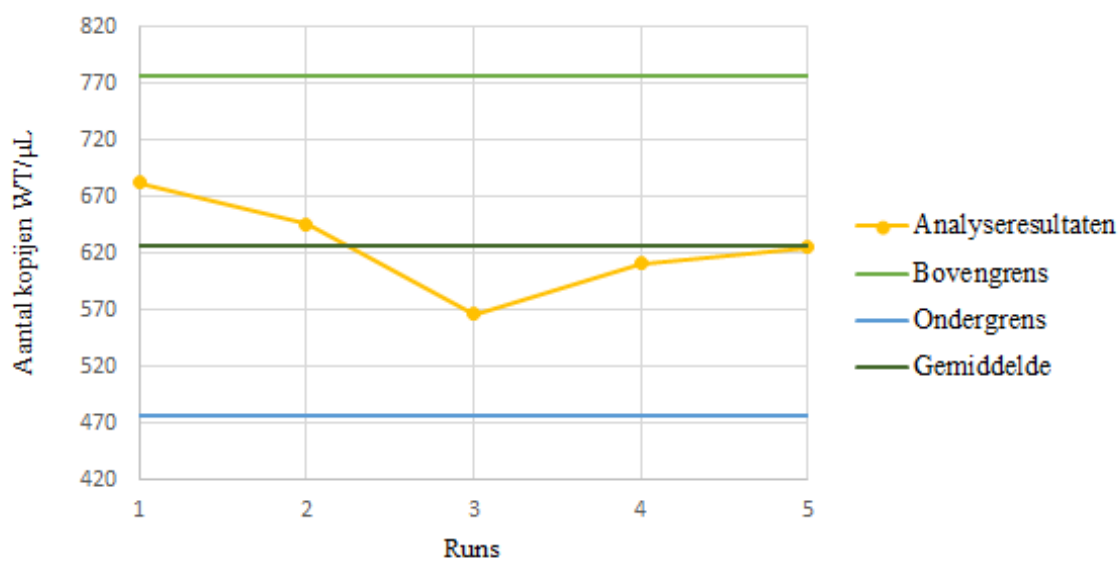


⁶ De sterkst afwijkende waarde wordt weggelaten (run 3) en er wordt een zesde run uitgevoerd

p.T315I-singleplex gBlock

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	682	476	776	3.0	1.6	4.0
2	646	476	776	3.0	1.6	4.0
3	566	476	776	2.6	1.6	4.0
4	611	476	776	2.4	1.6	4.0
5	625	476	776	3.2	1.6	4.0

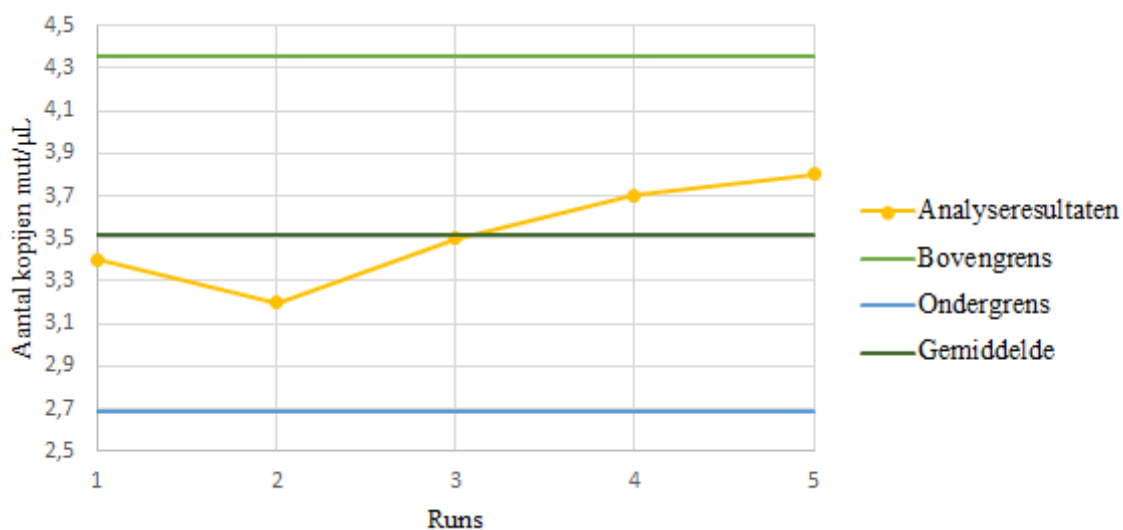
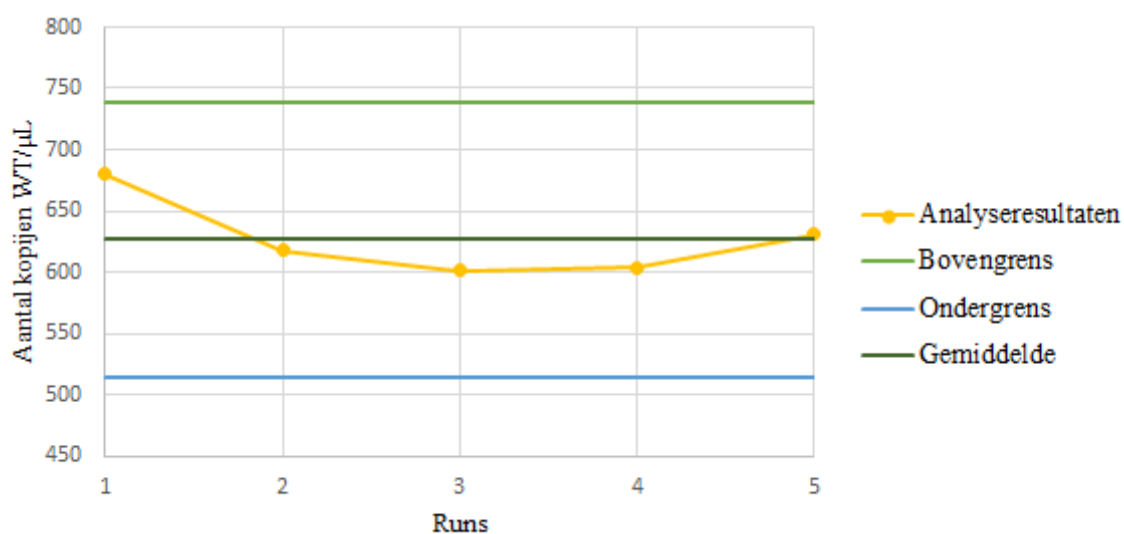
Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
626	42.9	150	OK	2.8	0.35	1.2	OK



p.F317L-singleplex gBlock

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	680	515	739	3.4	2.7	4.4
2	618	515	739	3.2	2.7	4.4
3	601	515	739	3.5	2.7	4.4
4	604	515	739	3.7	2.7	4.4
5	631	515	739	3.8	2.7	4.4

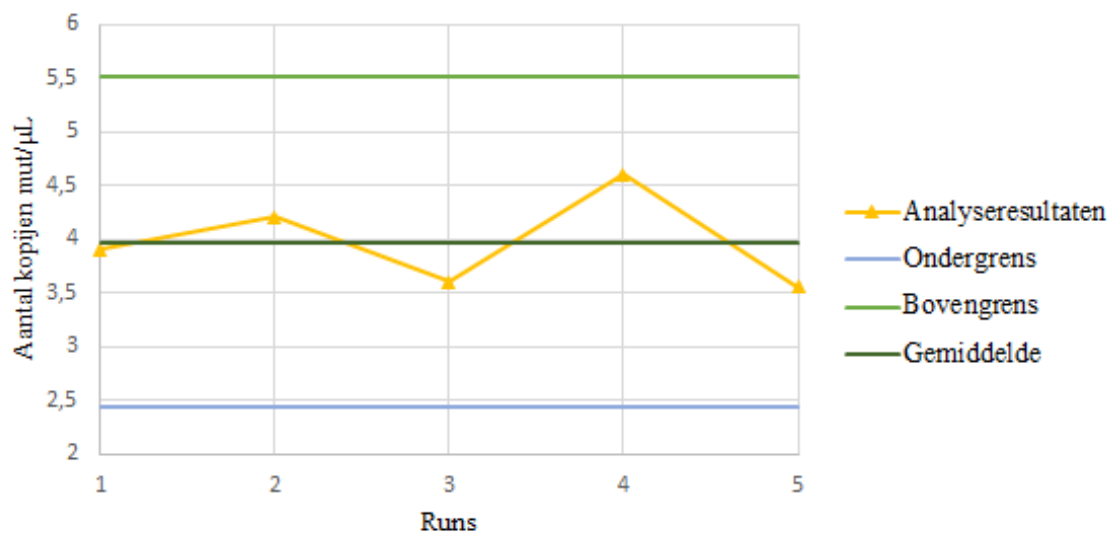
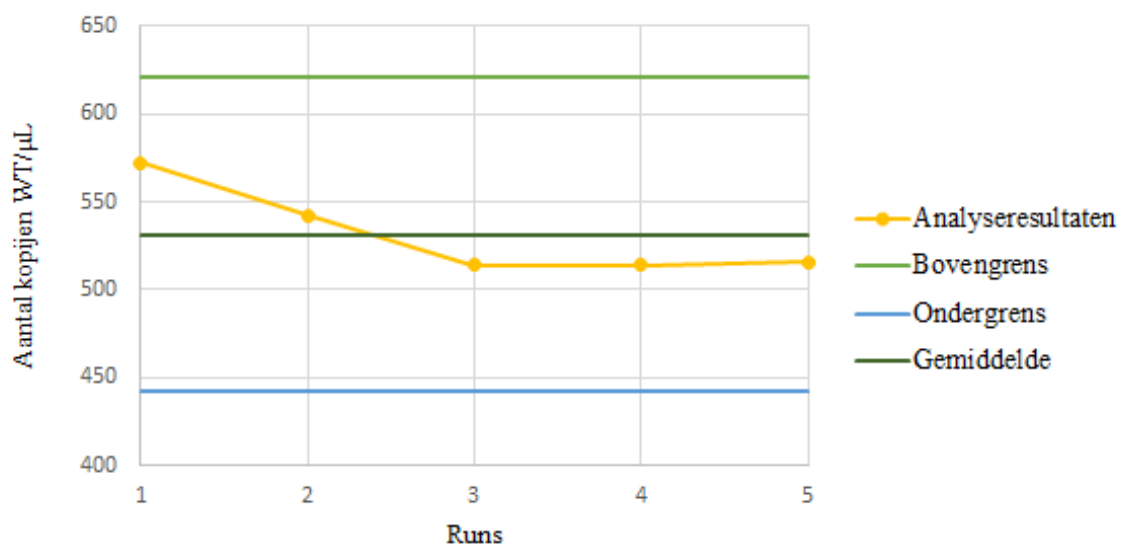
Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
627	32.0	112	OK	3.5	0.24	0.84	OK



p.F359V-singleplex gBlock

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	572	442	621	3.9	2.4	5.5
2	542	442	621	4.2	2.4	5.5
3	514	442	621	3.6	2.4	5.5
4	514	442	621	4.6	2.4	5.5
5	516	442	621	3.6	2.4	5.5

Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
532	25.6	89.6	OK	4.0	0.4	1.5	OK



Bijlage F: Werkblad multiplex-reactiemix ABL1-mutatieanalyse aan 1/2-volumes primer/probe-assay



ACTIVITEITENCENTRUM
MOLECULAIRE DIAGNOSTIEK



eddPCR

WERKBLAD digital droplet PCR

CEMOL-MT263-eWB01

I. PCR:

Uitvoerder ddPCR:

Datum ddPCR:

I. VERDUNNEN VAN DE DNA STALEN:

verdun de stalen zoals aangegeven naast het staal

Lotnummer:

..... Nuclease vrij water

II. VERDUNNEN VAN HET RESTRICTIE ENZYME NAAR 2U/μl:

Lotnummer:

#μl/staal

Restrictie enzyme	0,2
Cutsmart Buffer	0,8
totaal	1

Restrictie enzym	Lotnummer RE	Lotnummer buffer
0		

III. REACTIEMIX AANMAKEN:

pipeteer (21 μl X aantal herhalingen) mix per epje en voeg (1 μl X aantal herhalinen) staal toe

Lotnummer:

#μl/staal

64084232	ddPCR Supermix for Probes	11
	20x mut/WT primer/probe	→ 0,5
	restrictie enzyme 2U(verdund)	1
.....	H2O	7,5
	totaal	21

#μl	Multiplex A
0,5	ABL1-p.Q252H
0,5	ABL1-p.V299L
0,5	ABL1-p.F359V

Lotnummer:

#μl/staal

64084232	ddPCR Supermix for Probes	11
	20x mut/WT primer/probe	→ 0,5
	restrictie enzyme 2U(verdund)	1
.....	H2O	8
	totaal	21

#μl	Multiplex B
0,5	ABL1-p.Y253H
0,5	ABL1-p.T315I

Lotnummer:

#μl/staal

64084232	ddPCR Supermix for Probes	11
	20x mut/WT primer/probe	→ 0,5
	restrictie enzyme 2U(verdund)	1
.....	H2O	8
	totaal	21

#μl	Multiplex C
0,5	ABL1-p.E255K
0,5	ABL1-p.F317L

V. DROPLET GENERATIE, TRANSFER NAAR 96-WELL PLAAT EN SEALEN VAN DE PLAAT

Lotnummers:

64052952	Droplet Generation Oil
20161107	Droplet Generator DG8 Gasket
000080069	DG8 Cartridge
100421	Pierceable Foil Heat Seal
64075307	ddPCR 96-Well Plates
64073815	2X ddPCR Buffer Control for Probes

VI. PCR:

Toestel:

Uur PCR:

Controle PCR-progr:

PCR-programma:

95°C - 10 min

ramp rate 2°C/sec

94°C - 30 sec

40 cycli

55°C - 1 min

98°C - 10 min

12°C - ∞

ramp rate 1°C/sec

Reactievolume: 40 µl

Uitvoerder interpretatie:

Datum interpretatie:

Controle interpretatie:

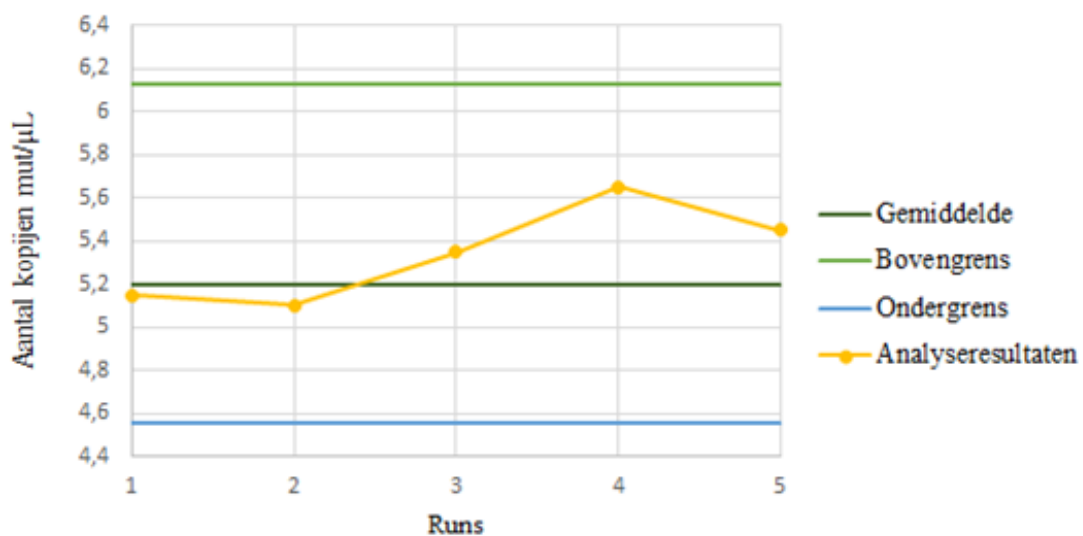
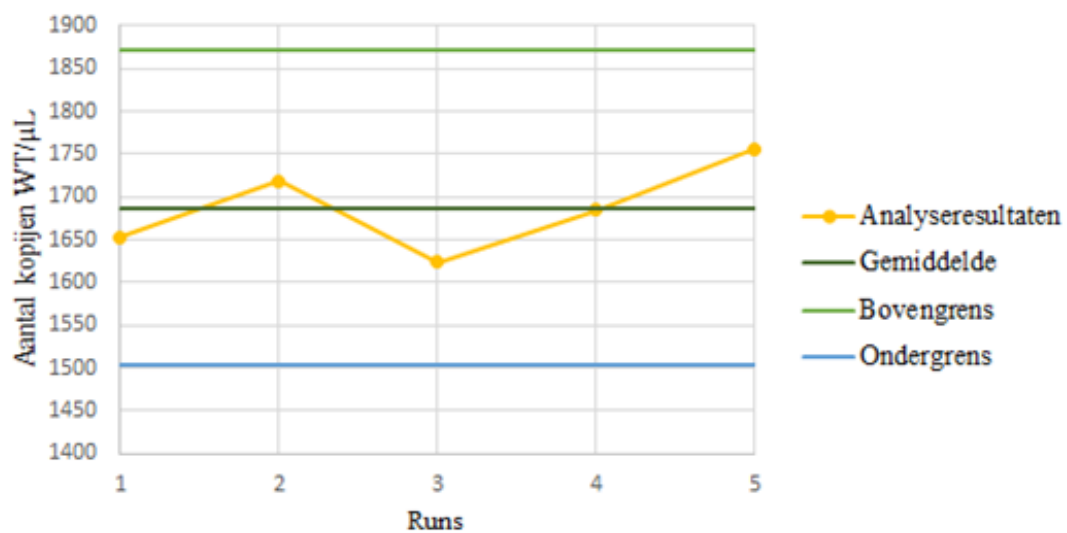
Datum controle interpretatie:

Bijlage G: Controlegrafiek gBlock-mix in ½-volume primer/probe-assay

gBlock-mix A in multiplex-reactiemix A

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	1653	1504	1871	5.2	4.6	6.1
2	1719	1504	1871	5.1	4.6	6.1
3	1624	1504	1871	5.4	4.6	6.1
4	1685	1504	1871	5.7	4.6	6.1
5	1757	1504	1871	5.5	4.6	6.1

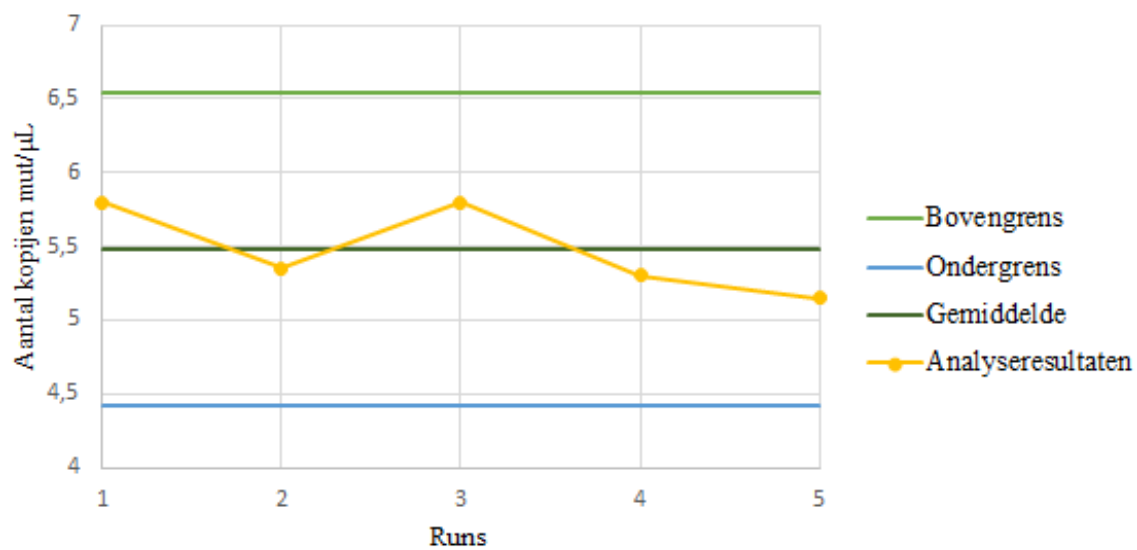
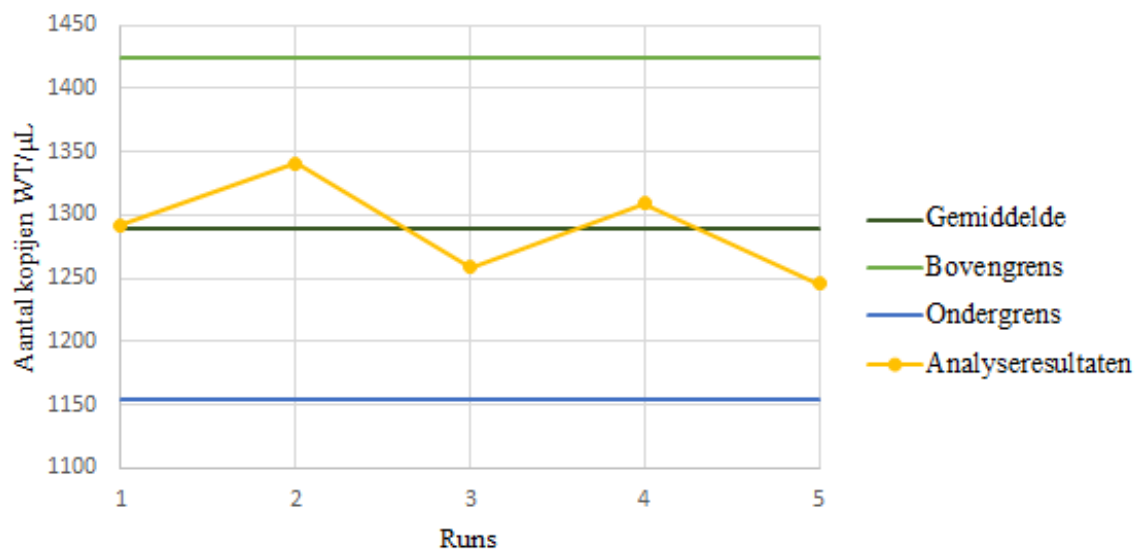
Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
1687	52.54	183.9	OK	5.3	0.22	0.79	OK



gBlock-mix B in multiplex-reactiemix B

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	1292.5	1154	1425	5.8	4.4	6.5
2	1341	1154	1425	5.4	4.4	6.5
3	1258.5	1154	1425	5.8	4.4	6.5
4	1309.5	1154	1425	5.3	4.4	6.5
5	1245.5	1154	1425	5.2	4.4	6.5

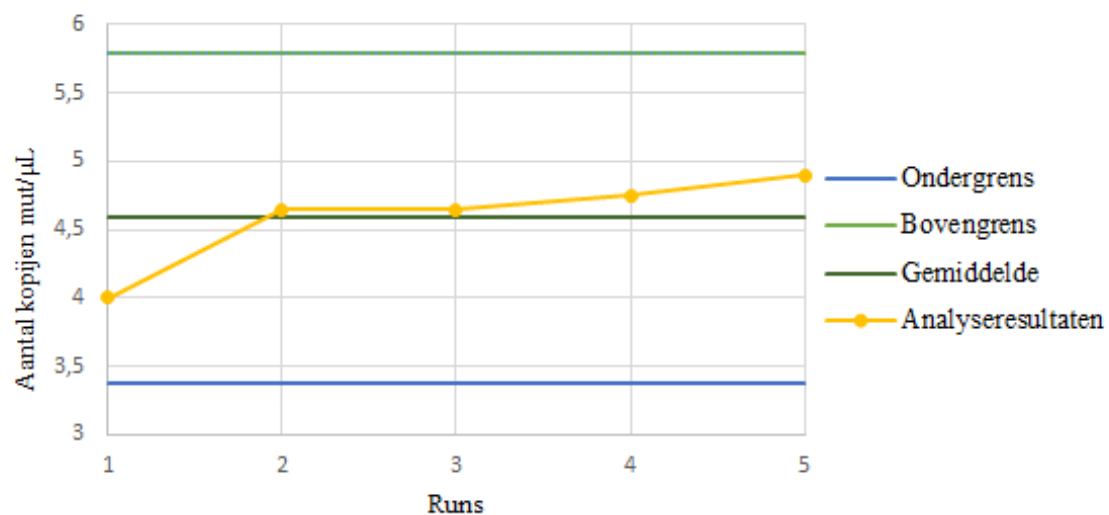
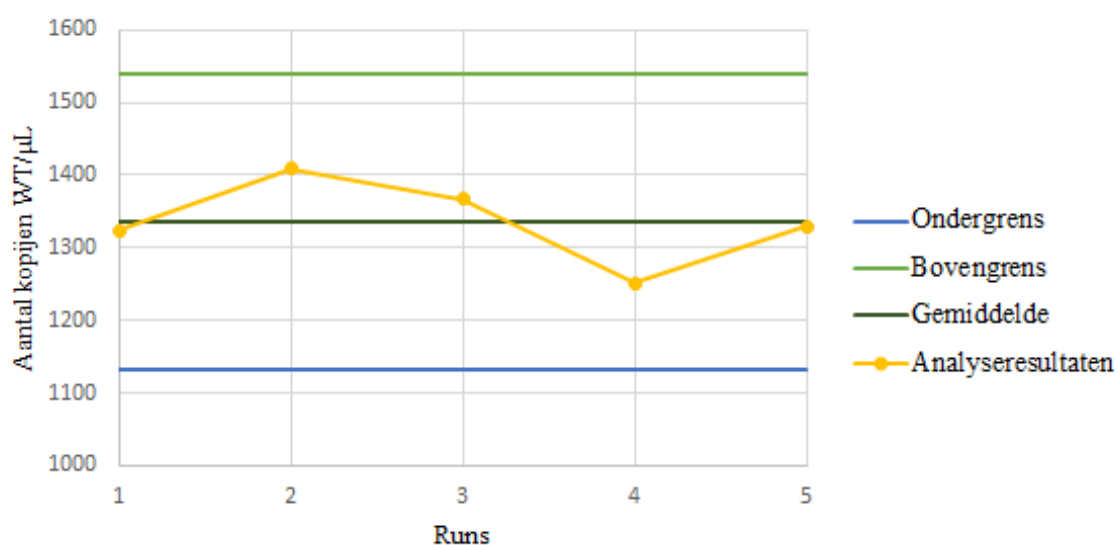
Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
1289	38.59	135.1	OK	5.5	0.30	1.1	OK



gBlock-mix C in multiplex-reactiemix C

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	1324.5	1132	1541	4.0	3.4	5.8
2	1409.5	1132	1541	4.7	3.4	5.8
3	1367	1132	1541	4.7	3.4	5.8
4	1252	1132	1541	4.8	3.4	5.8
5	1329	1132	1541	4.9	3.4	5.8

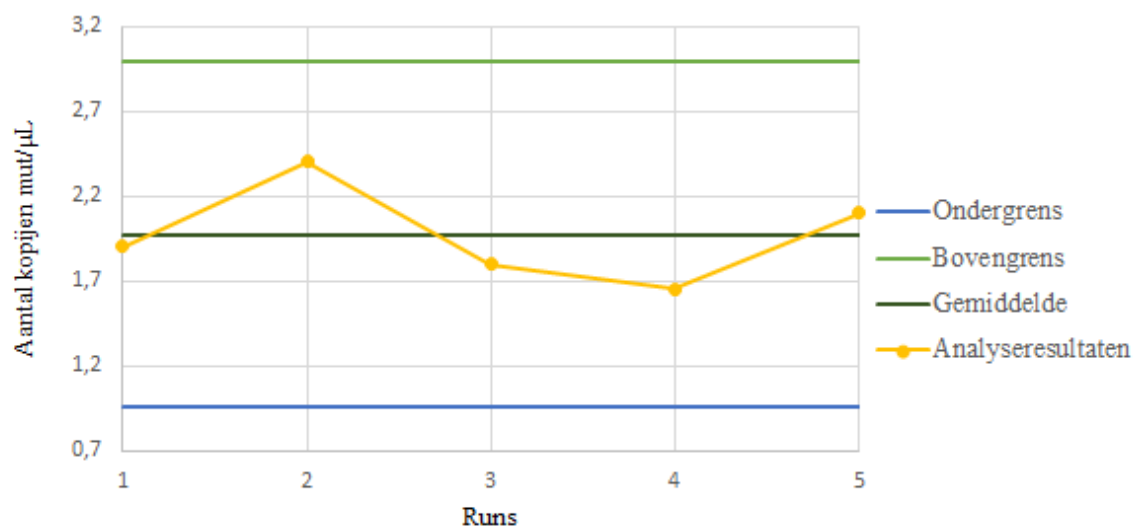
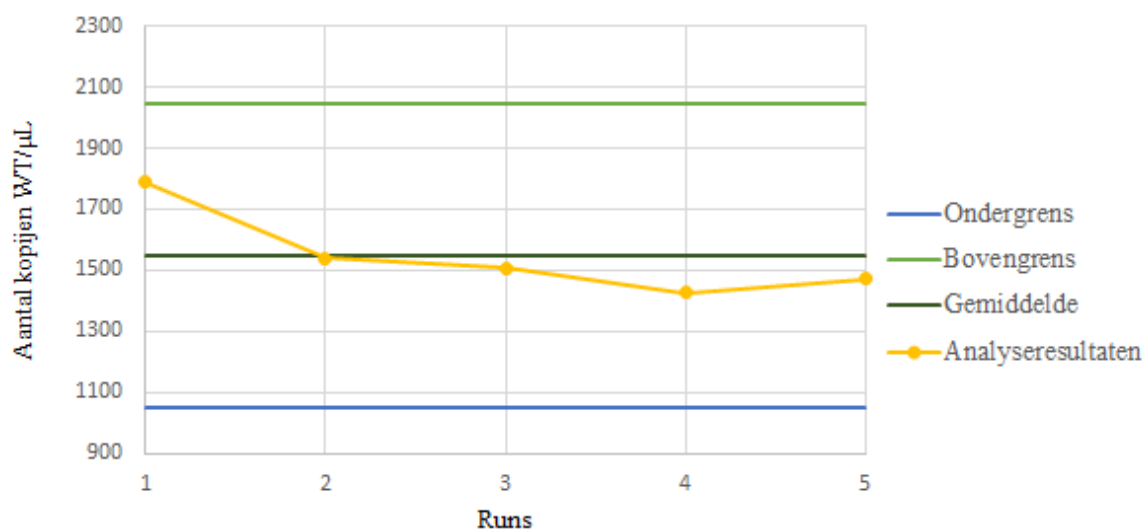
Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
1336	58.31	204.1	OK	4.6	0.35	1.2	OK



p.V299L-singleplex gBlock in multiplex-reactiemix A

Run nr.	Kopijen WT/ μ L	Ondergrens	Bovengrens	Kopijen mut/ μ L	Ondergrens	Bovengrens
1	1790	1049	2045	1.9	1.0	3.0
2	1539	1049	2045	2.4	1.0	3.0
3	1509	1049	2045	1.8	1.0	3.0
4	1425	1049	2045	1.7	1.0	3.0
5	1473	1049	2045	2.1	1.0	3.0

Gemiddelde WT	Stdev WT	3.5*stdev WT	Controle	Gemiddelde mut	Stdev mut	3.5*stdev mut	Controle
1547	142.3	498.1	OK	1.2	0.29	1.0	OK



Bijlage H: Wizard voor opzuivering DNA-staal

Lotnummer of datum

vvvvv

Kit

22222

Baxter water

3333

80% isopropanol

444

TE 1/0,1 pH 7,4

Werkwijze:

- dompelwaterbad of verwarmingsblok op 80°C zetten. TE 1/0,1 pH 7,4 laten opwarmen tot 80°C.
- het volume op te zuiveren DNA moet tussen 50 en 500 µl liggen. Indien het volume kleiner is dan 50 µl, wordt het aangelengd tot 50 µl met Baxter water.
- per staal wordt 1 minikolom en spuitje benoemd. Deze twee op de vacuümpomp bevestigen.
- de Resin goed opmengen en daarna 1 ml Resin toevoegen aan elk staal. Dit geheel goed opmengen door de microtubes enkele malen om te draaien. Daarna het geheel in het spuitje pipetteren dat op de minikolom bevestigd zit.
- vacuüm open doen.
- vacuüm toe doen, 2 ml 80% isopropanol in spuitje pipetteren, vacuüm open doen.
- vacuüm toe doen, 1 ml 80% isopropanol in spuitje pipetteren, vacuüm open doen.
- na de wasstappen het vacuüm toedoen en de spuit verwijderen, het kolommetje op een microtube van 1,5 ml brengen.
- de microtube met kolommetje 2 min centrifugeren op 10.500 tpm.
- na centrifugeren het kolommetje op een nieuwe microtube brengen.
- daarna 50 µl voorverwarmde TE 1/0,1 pH 7,4 op de kolom brengen, 1 minuut wachten.
- 35 sec centrifugeren op 10.500 tpm.
- het gezuiverde DNA wordt nu opgevangen in de microtube.

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Gebruik van gBlocks als positieve ddPCR-controle voor de detectie van therapieresistente mutaties in BCR-ABL1-positieve leukemie

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**
Jaar: **2018**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Melon, Steffi

Datum: **9/06/2018**