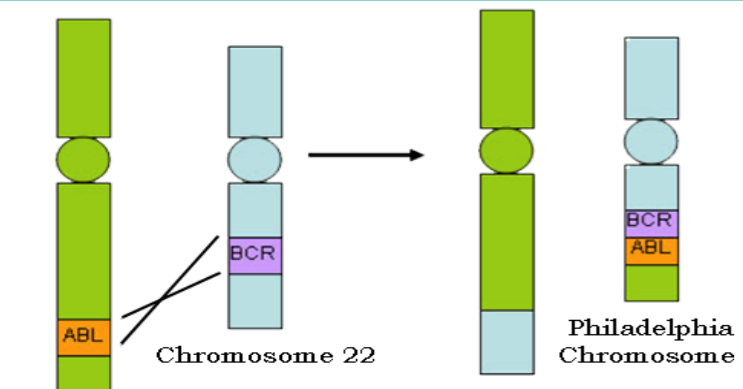


Gebruik van gBlocks als positieve ddPCR-controle voor de detectie van therapieresistente mutaties in BCR-ABL1-positieve leukemie

Steffi Melon

master IIW biochemie

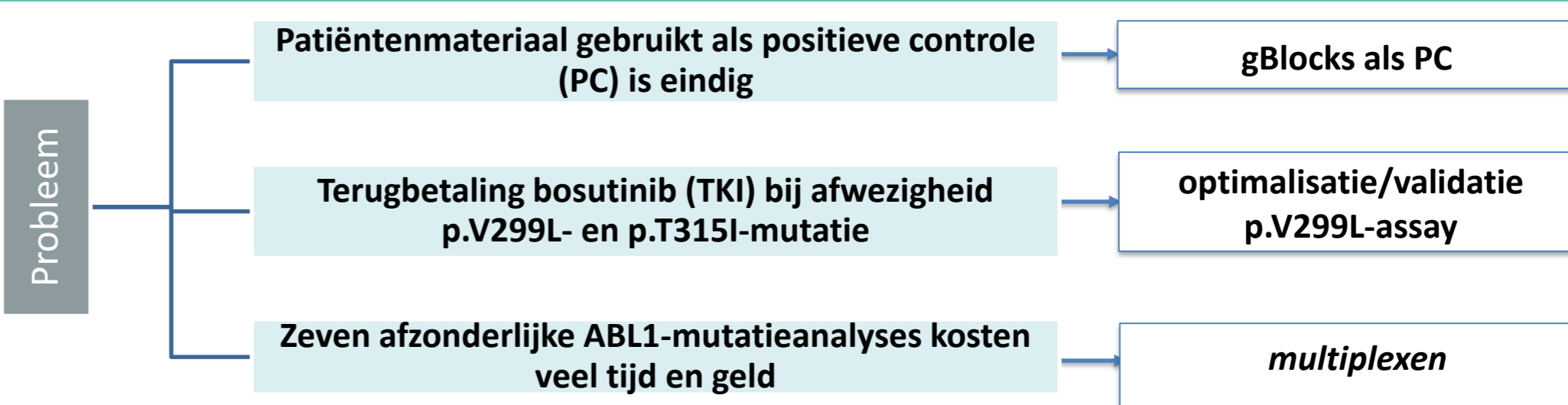
SITUERING



Philadelphia positieve leukemie is het gevolg van een reciproke translocatie tussen chromosoom 9 en 22 waardoor een BCR-ABL1-fusiegen gevormd wordt (Figuur 1). Patiënten met dit fusiegen worden behandeld met tyrosinekinase-inhibitoren (TKI). Door de aanwezigheid van puntmutaties in het BCR-ABL1-fusiegen kan therapieresistentie optreden [1].

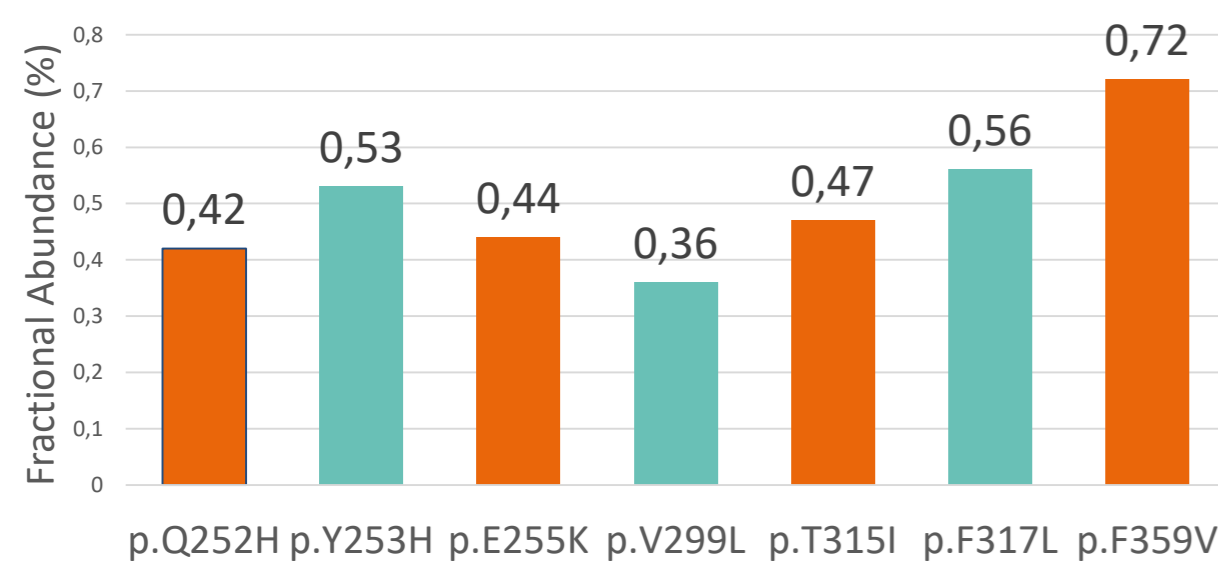
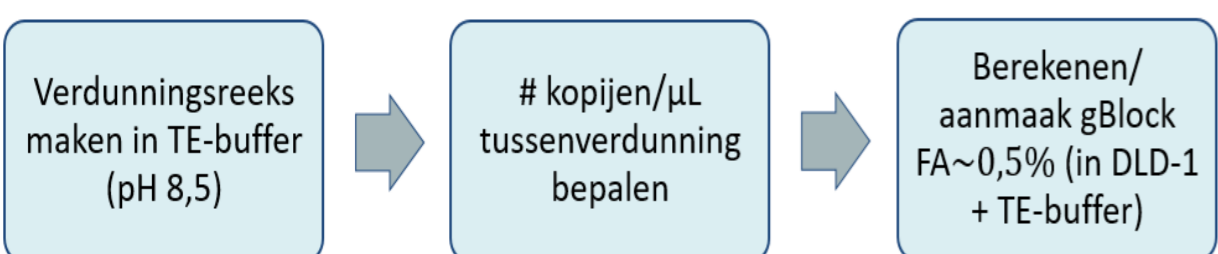
Figuur 1: Vorming twee hybridegenen door translocatie t(9;22) [1]

PROBLEEM/DOELSTELLING



RESULTATEN

gBlocks als PC



Figuur 3: Bekomen FA verschillende gBlocks

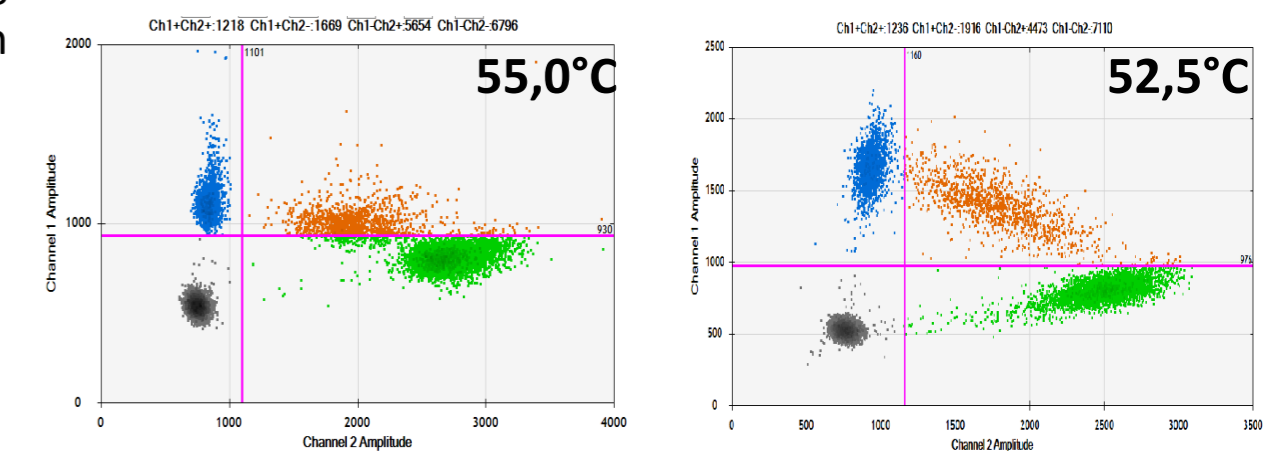
De FA geeft het percentage weer van het aantal mutante kopijen/μL t.o.v. het totale aantal kopijen/μL (wildtype en mutant). In Figuur 3 wordt de FA weergegeven van de zeven verdunde ABL1-gBlock-condities in TE-buffer en DLD-1. Deze bereiken een FA gelegen rond het beoogde doel van 0,5%.

Optimalisatie p.V299L-assay

Bij een eerste test met de p.V299L-assay, onder het huidige protocol (100 ng/μL, 55°C en MseI), zijn de vier cluster slecht van elkaar gescheiden. Drie parameters worden aangepast (Tabel 1). Enkel een annealingtemperatuur van 52,5°C zorgt voor een optimale clusterscheiding (Figuur 4), de andere parameters hebben geen invloed.

DNA-input	Annealingtemperatuur	Restrictie-enzym (RE)
• 100 ng/μL	• 49°C – 53,7°C	• MseI
• 10 ng/μL	• temperatuurgradiënt	• HaeIII

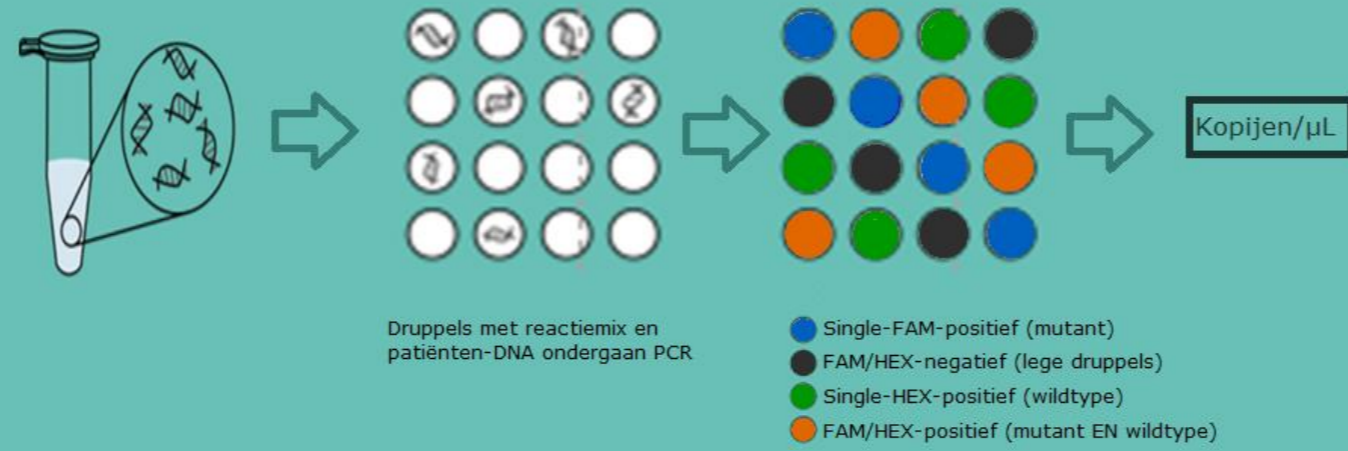
Tabel 1: Aanpassing parameters voor optimalisatie p.V299L-assay



Figuur 4: Optimalisatie clusterscheiding door aanpassing annealingtemperatuur

Droplet digitale PCR

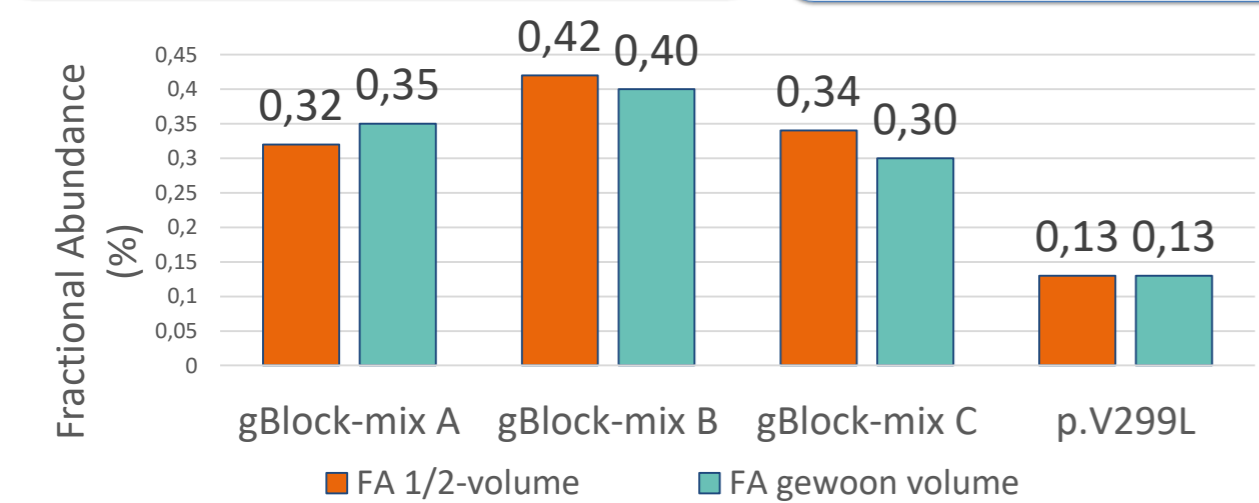
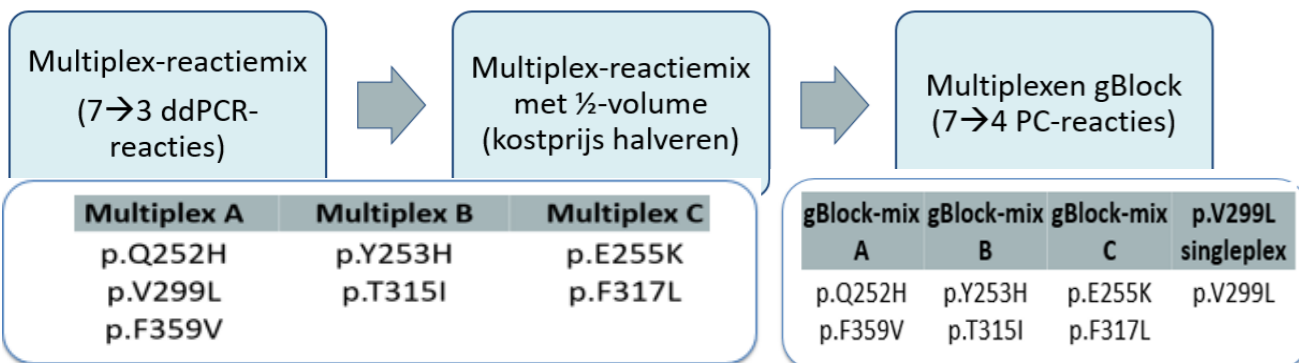
Droplet digitale PCR (ddPCR) wordt gebruikt voor de ABL1-mutatieanalyse. Hierbij worden duizenden druppels gegenereerd voorafgaand aan de PCR-reactie. Twee competitieve fluorescent-gelabelde probes worden gebruikt: FAM en HEX (Figuur 2). Na de PCR meet een detector de fluorescentie van elke druppel. Op basis hiervan wordt het aantal kopijen/μL berekend [2].



Figuur 2: Principe droplet digitale PCR [2]

Multiplexen

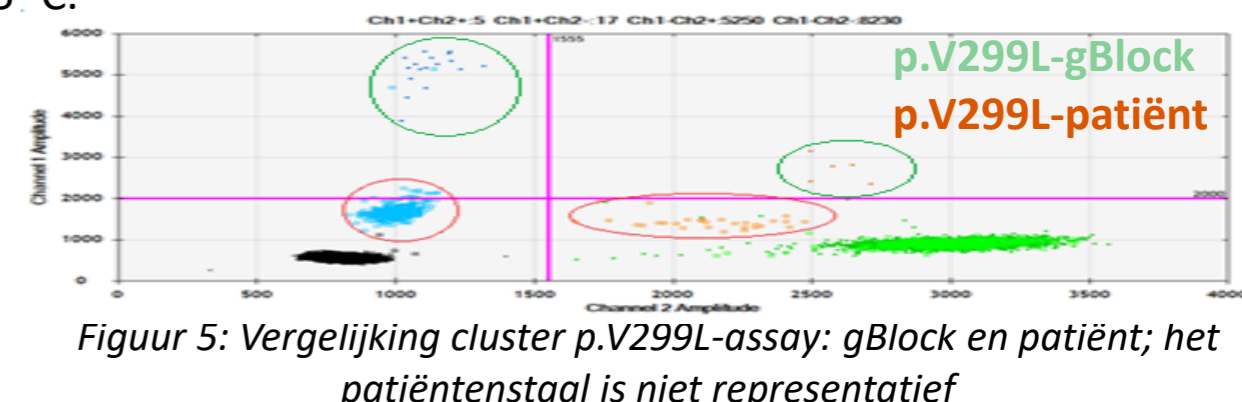
Reductie van 7→3 ddPCR-reactiemixen en 7→4 positieve controles. De p.V299L-gBlock wordt apart meegenomen als PC. De gBlock-mixen bereiken eenzelfde FA zowel bij het 1/2-primer/probe-assayvolume als bij het gewone volume (Figuur 6).



Figuur 6: Vergelijking FA bij gereduceerd volume primer/probe-assay

Validatie p.V299L-assay

Omdat de p.V299L-gBlock, net zoals de overige 6 gBlocks, wel een optimale clusterscheiding vertoont bij 55°C (Figuur 5), wordt de p.V299L-assay gevalideerd onder het huidige protocol met: RE MseI, DNA-input 100 ng/μL en annealingtemperatuur 55°C.



Figuur 5: Vergelijking cluster p.V299L-assay: gBlock en patiënt; het patiëntstaal is niet representatief

Juistheid	Reproduceerbaarheid	Robuustheid	Detectielimiet
<ul style="list-style-type: none"> FPR (negatieve patiëntstaal) Positieve patiëntstaal Derdelijnscontrole 	<ul style="list-style-type: none"> Inter-runvariatie Intra-runvariatie o.b.v. positieve patiëntstaal 	<ul style="list-style-type: none"> Staalsoort Uitvoerder Extractiemethode 	<ul style="list-style-type: none"> o.b.v. p.V299L-gBlock

Tabel 2: Gevalideerde prestatiekenmerken

CONCLUSIE

gBlocks als PC

De gBlocks kunnen geïmplementeerd worden als positieve controle voor de verschillende ABL1-mutatieassays. Deze bereiken allemaal een FA gelegen rond 0,5%.

Optimalisatie p.V299L-assay

De p.V299L-assay kan toegepast worden met hetzelfde protocol als de 6 andere ABL1-mutatieassays met: RE MseI, DNA-input 100 ng/μL en annealingtemperatuur 55°C.

Validatie p.V299L-assay

Uit de validatie kan besloten worden dat de methode (droplet digitale PCR) robuust, reproduceerbaar en juist is.

Multiplexen

Bij het multiplexen blijven de gBlocks detecteerbaar. Door gebruik te maken van 1/2-volume primer/probe-assay wijzigt de FA niet.

Promotoren / Copromotoren:

Dr. Apr. Els Lierman
Dr. Ir. Kristel Sniegowski

[1] M. Sattlermc en J. D.Griffin, „Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene, Seminars in Hematology, vol. 40, nr. 2, pp. 4-10, April 2003.

[2] Bio-Rad, „Rare mutation detection best practices guidelines,“ [Online].