

## Real Time PCR-kwantificering van fusiegenen en de detectie van 'minimal-residual disease' op de LightCycler 480 en ABI 7500 Fast

A.L.M. STRUNK, A. ABBES en H. ENGEL

### Inleiding

In de afgelopen jaren zijn er verschillende technieken ontwikkeld voor de detectie van diverse fusiegenen met betrekking tot leukemie. Deze specifieke genetische afwijkingen kunnen aangetoond worden met behulp van Fluorescence in situ Hybridisation (FISH), Southern blotten en northern blotten (1, 3). Het nadeel van deze technieken is dat ze vaak een erg lage gevoeligheid hebben. De detectiegrens ligt niet lager dan 1-5% afwijkende cellen tussen normale cellen (3). Met de (real time) polymerasekettingreactie (PCR) daarentegen, kan wel een hogere gevoeligheid gehaald worden, waarbij een gevoeligheid van 1 afwijkende cel tussen 10.000 normale cellen (0,0001%) eenvoudig te halen is (1- 3). Hierdoor is deze techniek uitstekend geschikt voor de detectie en 'minimal residual disease'-(MRD)-bepaling bij leukemieën

De meest voorkomende fusiegenen met betrekking tot leukemie zijn: BCR-ABL, PML-RAR $\alpha$ , AML1-ETO, CBF $\beta$ -MYH11 en MLL met verschillende fusiepartners. Het aantonen van een specifiek fusiegen bij leukemie is van groot belang omdat de keuze van de behandeling vaak afhangt van de aan- of afwezigheid van zo'n fusiegen en het geeft tevens aan of de prognose van een patiënt goed of slecht is. Na het aantonen van een specifiek fusiegen, kan de patiënt herhaaldelijk onderzocht worden (follow-up-screening) op de aanwezigheid van het desbetreffende fusiegen en indien dit bij follow-up nog wordt aangetoond, wat de hoeveelheid daarvan is.

In Nederland is er een werkgroep die de moleculaire diagnostiek van de HOVON-studies coördineert (MODHEM). Hierbij wordt er aandacht besteed aan het op de juiste wijze uitvoeren van diagnostiek en worden criteria vastgesteld welke betrekking hebben op de sensitiviteit en specificiteit van een bepaling. De MODHEM organiseert meerdere keren per jaar een kwaliteitsronzending voor de deelnemende laboratoria.

### Methode

In dit onderzoek hebben wij een Real Time kwantitatieve PCR voor de detectie van diverse fusiegenen, welke in ons laboratorium operationeel is op de ABI 7700 (Applied Biosystems), overgezet naar de LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Ditzelfde protocol

is tevens toegepast voor de ABI 7500 Fast, een vernieuwde versie van de ABI 7700, om zo beide Real Time PCR-systemen te vergelijken voor de detectie en kwantificering van fusiegenen. Voor de synthese van cDNA werd 1  $\mu$ g RNA geïsoleerd uit leukocyten en gebruikt in een Reverse Transcriptase PCR-reactie (RT-PCR) op een standaard PCR-apparaat. Het verkregen cDNA werd vervolgens gebruikt voor de specifieke Real Time kwantitatieve PCR van fusiegenen op de LightCycler 480 en de ABI 7500 Fast. Voor de Real Time PCR werden dezelfde primers en probes gebruikt (tabel 1), zoals deze beschreven zijn door het 'Europe Against Cancer' (EAC-)programma.

Om de gevoeligheid van de Real Time PCR voor een specifiek fusiegen te bepalen en om een standaard curve te genereren voor het kwantificeren van het fusiegen is gebruik gemaakt van cellijnverdundingen die dit specifieke fusiegen bevatten. Deze cellijnverdundingen zijn verdund met normaal RNA, verkregen uit leukocyten van gezonde vrijwilligers, in verdunningsstappen van tien. De hoogste verdunning van een cellijncontrole is een verdunning van 1.000.000 ( $10^{-6}$ ). Naast positieve cellijnen werden ook plasmidstandaarden gebruikt met een bekende hoeveelheid kopieën van dit fusiegen in een range van 10 tot  $10^6$ . Normaal RNA van gezonde personen werd gebruikt als negatieve controle.

Alle cellijnverdundingen, plasmidstandaarden en negatieve controles zijn voor elk fusiegen in duplo geanalyseerd op beide Real Time PCR-systemen. De analyse van alle fusiegenen met bijbehorende positieve en negatieve controles is 6 keer herhaald, waarbij iedere keer nieuw cDNA werd gebruikt.

De cyclus waarbij een specifiek fusiegen boven de detectiegrens komt wordt ook wel Ct ('cycle threshold') of Cp ('crossing point') genoemd. Aan de hand van een standaardcurve (ijklijn) kan de efficiëntie van de Real Time PCR van een fusiegen beoordeeld worden. De theoretische efficiëntie van een PCR-reactie is twee: in iedere PCR-cyclus vindt een verdubbeling van het PCR-product plaats. Als gevolg van allerlei remmende factoren zal deze efficiëntie altijd iets lager zijn dan twee. De efficiëntie kan worden afgeleid uit de slope van de standaardcurve met de volgende formule: efficiëntie =  $10^{-1/slope}$ , en wordt automatisch berekend met de bijbehorende software op de LightCycler 480.

Voor de kwantificering van fusiegenen werd de gelijktijdige amplificatie van een controlegen, in dit geval het huishoudgen  $\beta$ -glucuronidase (GUS) uitgevoerd, om hiermee resultaten te normaliseren voor verschil in cDNA-input en cDNA-kwaliteit.

**Tabel 1.** Primers en probes voor de detectie van diverse fusiegenen, zoals beschreven door de Europe Against Cancer program

Fusiegen	Primer/Probe	EAC-code	Sequentie (5'-3')
AML1-ETO t(8;21)(q22;q22)	Primer	ENF701	CACCTACCACAGGCCATCAAA
		ENR761	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT
	Probe	ENP747	AACCTCGAA/ATCGTACTGAGAAGCACTCCA
BCR-ABL t(9;22)(q34;q11)	Primer	ENF402	CTGGCCCAACGATGGCGA
		ENF501	TCCGCTGACCATCAAYAAGGA
		ENR561	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA
	Probe	ENP541	CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA
CBFβ-MYH11 inv(16)(p13;q22)	Primer	ENF803	CATTAGCACAACAGGCCTTTGA
		ENR862	AGGGCCCGCTTGGACTT
		ENR863	CCTCGTTAAGCATCCCTGTGA
		ENR865	CTCTTTCTCCAGCGTCTGCTTAT
	Probe	ENPr843	TCGCGTGTCCCTTCTCCGAGCCT
MLL-AF4 * t(4;11)(q21;q23)	Primer	ENF207	CCCAAGTATCCCTGTAAAACAAAAA
		ENF208	GATGGAGTCCACAGGATCAGAGT
		ENR262	GAAAGGAAACTTGGATGGCTCA
	Probe	ENP242	CATGGCCGCCTCCTTTGACAGC
PML-RARα t(15;17)(q22;q21)	Primer	ENF903	TCTTCTGCCCAACAGCAA
		ENF906	ACCTGGATGGACCGCCTAG
		ENF905	CCGATGGCTTCGACGAGTT
		ENR962	GCTTGTAGATGCGGGGTAGAG
	Probe	ENP942	AGTGCCAGCCCTCCCTCGC
GUS	Primer	ENF1102	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
		ENR1162	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA
	Probe	ENP1142	CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTCA

\* MLL is enkel getest met fusiepartner AF4

**Tabel 2.** Efficiëntie en gevoeligheid van diverse fusiegenen van cellijn en plasmide. Voor de cellijnen staat een gevoeligheid van 10<sup>-5</sup> voor een detectie van 1 afwijkende cel tussen 100.000 normale cellen. Het aantal kopieën fusiegenen van de plasmidestandaarden zijn opgegeven door de producent.

	Fusiegen		LightCycler 480 Efficiëntie standaard- curve (± SD)	ABI 7500 Fast Efficiëntie standaard- curve (± SD)	Gevoeligheid
BCR-ABL	Cellijn	K-562	1,97 ± 0,02	1,91 ± 0,01	10 <sup>-5</sup>
		BV-173	1,96 ± 0,03	1,92 ± 0,02	10 <sup>-5</sup>
		SD-1	1,96 ± 0,02	1,95 ± 0,03	10 <sup>-4</sup>
	Plasmide	b3a2	1,91 ± 0,05	1,95 ± 0,05	10 kopieën
		ela2	1,94 ± 0,03	1,93 ± 0,07	10 kopieën
PML-RARα	Cellijn	NB-4	1,94 ± 0,07	1,89 ± 0,08	10 <sup>-3</sup> /10 <sup>-4</sup>
	Plasmide	bcr1	1,97 ± 0,04	1,92 ± 0,02	10 kopieën
MLL-AF4	Cellijn	MV4-11	1,99 ± 0,03	1,93 ± 0,02	10 <sup>-4</sup>
	Plasmide	e9e5	2,00 ± 0,03	1,92 ± 0,02	10 kopieën
AML1-ETO	Cellijn	Kasumi-1	1,97 ± 0,02	1,96 ± 0,02	10 <sup>-5</sup>
	Plasmide	fgrs1	1,96 ± 0,02	1,95 ± 0,03	10 kopieën
CBFβ-MYH11	Cellijn	ME-1	1,94 ± 0,04	1,95 ± 0,02	10 <sup>-5</sup>
	Plasmide	A	1,99 ± 0,05	1,95 ± 0,02	10 kopieën
GUS	Plasmide	cgrs3	1,95 ± 0,04	1,98 ± 0,02	10 kopieën

## Resultaten

Zowel op de LightCycler 480 als op de ABI 7500 Fast zijn reproduceerbare resultaten verkregen, aangezien de Cp-waarden (LightCycler 480) en Ct-waarden (ABI7500 Fast) die gevonden werden bij de diverse cellijnverduunningen en plasmidstandaarden een constante waarde hadden met een standaarddeviatie van maximaal 0,5 Cp/Ct, wat een verschil in hoeveelheid betekent van  $2^{0.5}$ . Een gevoeligheid van  $10^{-4}$  werd gehaald voor alle fusiegenen, behalve voor PML-RAR $\alpha$ . De gevoeligheid van PML-RAR $\alpha$  ligt op ons laboratorium tussen de  $10^{-3}$  en  $10^{-4}$ . Dit geldt voor zowel de LightCycler 480, als voor de ABI 7500 Fast. Ook de ABI 7700, waarop wij PML-RAR $\alpha$  amplificeren, heeft dezelfde gevoeligheid, en PML-RAR $\alpha$  blijkt dus een moeilijk fusiegen te zijn om te amplificeren.

Van zowel de plasmidstandaarden als voor de cellijnenverduunningen ( $10^0$  t/m  $10^{-4}$ ) werd een standaardcurve geanalyseerd en de PCR-efficiëntie berekend (zie tabel 2). De efficiëntie van alle fusiegenen valt binnen een gebied van  $1,96 \pm 0,08$ . Deze waarde valt binnen de in ons laboratorium gehanteerde acceptatiegebied van 1,85-2,10.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 208-210

## Moleculaire diagnostiek als hulpmiddel bij erfelijke nierziekten

A.L.M. STRUNK<sup>1</sup>, H. JOOSTEN<sup>2</sup>, A.P. ABBES<sup>1</sup>, J.R. BEUKHOF<sup>2</sup> en H. ENGEL<sup>1</sup>

### Inleiding

De afgelopen jaren is de kennis met betrekking tot genetische diagnostiek bij erfelijke nierziekten sterk uitgebreid (1-5). Indien er een duidelijke positieve familieanamnese is dan is het relatief eenvoudig om een genetische nierziekte te diagnostiseren. Echter, een aantal nierziekten die zich na de kinderjaren ontwikkelen, kunnen een zeer aspecifiek en weinig symptomatisch beloop hebben.

In deze zoektocht naar de oorzaak van nierfalen resulteren familieanamnese en aanvullend onderzoek niet altijd in een duidelijke diagnose. In dat geval kan genetisch onderzoek van essentiële waarde zijn in het diagnostisch traject, waarbij de beschikbare klinische gegevens van de familie gebruikt worden bij het zoeken naar een verantwoordelijk gen. Om tot een juiste diagnose te komen bij patiënten met nierfalen, is er een samenwerkingsverband in ons ziekenhuis met de pathologie, nefrologie en klinische chemie opgezet. Op basis van kenmerken van het urinesediment, klinische kenmerken en leeftijd van een patiënt met nierfalen wordt een waarschijnlijkheidsdiagnose gesteld.

*Afdeling Klinische Chemie<sup>1</sup> en afdeling Interne Geneeskunde en Nefrologie<sup>2</sup>, Isala klinieken, Zwolle*

E-mail: h.engel@isala.nl

## Conclusie

Het protocol voor de detectie van fusiegenen met betrekking tot leukemie blijkt eenvoudig over te zetten van de ABI 7700 naar de LightCycler 480 en ABI 7500 Fast, en is op beide apparaten een snelle en betrouwbare methode gebleken. De resultaten vallen binnen de criteria zoals deze door de MODHEM vastgesteld zijn, en een gevoeligheid van detectie van 1 afwijkende cel tussen 10.000 normale cellen kan worden gehaald.

## Referenties

1. Jansen JH, et al. Moleculaire diagnostiek van myeloïde maligniteiten. Ned Tijdschr Hemat 2005; 2: 50-52.
2. Gabert J, et al, Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia- A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003; 17: 2318-2357.
3. Dongen JJM van, San Miguel JF. Techniques for detection of minimal residual disease in leukaemia patients. Meet the expert sessions of the second EHA. 29 May-1 June 1996, Paris France.

Aan de hand hiervan kan zeer gericht naar mutaties in één of enkele genen gezocht worden, welke de diagnose kunnen bevestigen. We onderscheiden de volgende autosomaal-dominante aandoeningen: medullaire cystenieren (MCD), 'glomerulocystic disease' (GCKD) en het Nail-Patella-syndroom. Autosomaal-recessieve ziekten als nefronofthisis, primaire oxalose en Alport's syndroom moeten echter ook in overweging worden genomen.

### Methode

In ons ziekenhuis zijn zeventien patiënten uit twaalf verschillende families onderzocht met verdenking op een genetische nierziekte. Naar aanleiding van hun familieanamnese, werd uitgezocht of het ging om autosomaal-dominante of autosomaal-recessieve overerving. Vervolgens werd aan de hand van de klinische kenmerken van de patiënt, de juiste genen geselecteerd welke mogelijk betrekking hebben op de nierziekte van de patiënt (zie tabel 1). Deze genen werden onderzocht op mutaties met behulp van sequentieanalyse. Bij twee families bestaande uit 3 en 4 familieleden was er een sterke verdenking voor juvenile nefronofthisis. Bij circa 85% van de patiënten wordt de juvenile nefronofthisis veroorzaakt door een grote deletie van 290 kb in genlocus 2q13. Als gevolg hiervan is het NPHP1-gen (135 kb) gedeleteerd (5). Voor het aantonen van de deletie